

541,354

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Juli 2004 (22.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/061456 A2(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/574,
A61K 38/17, C07K 14/47, C12Q 1/68, A61K 48/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/000030

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Januar 2004 (05.01.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 00 023.2 3. Januar 2003 (03.01.2003) DE
103 10 160.8 7. März 2003 (07.03.2003) DE
103 36 642.3 10. August 2003 (10.08.2003) DE
103 46 614.2 8. Oktober 2003 (08.10.2003) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **ALCEDO BIOTECH GMBH** [DE/DE]; Leobener
Strasse ZHG, 28359 Bremen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BULLERDIEK, Jörn**
[DE/DE]; In der Poggenkuhle 23, 28357 Bremen (DE).(74) Anwalt: **BOHMANN, Armin, K.**; Bohmann & Loosen,
Sonnestrasse 8, 80331 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des BerichtsZur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USES OF DNA BINDING PROTEINS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNGEN VON DNA-BINDENDEN PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to the use, especially in vitro, of one or more nucleic acids, the transcription product(s) thereof and/or the translation product(s) thereof for a process. Said process is selected from the group including angiogenesis, neovascularization, transmyocardial revascularization, wound healing, wound bed angiogenesis, epithelization and healing in of dental and bone implants. The nucleic acid(s) is/are selected from the group including the genes for high mobility group proteins.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung, insbesondere in vitro, einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung, Wundheilung, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/061456 A2

Verwendungen von DNA-bindenden Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte für Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung, Ent-Differenzierung von Zellen und/oder die Reprogrammierung von Zellen, für Geweberegeneration, für Beeinflussung der Gewebeeralterung und für die Wundheilung, Verfahren zur Angiogenese, Vaskularisierung, Neovaskularisierung und transmyokardialen Revaskularisierung sowie zur Geweberegeneration, Wundheilung, zur Beeinflussung der Gewebeeralterung, Verfahren zur Vaskularisierung, insbesondere bei Herzinfarkt und Einheilen bei Zahn- und Knochenimplantaten, Verfahren zur Regeneration von Gewebe, Verfahren zur Ent-Differenzierung und/oder Reprogrammierung von Zellen, Trägermaterial umfassend eine derartige Nukleinsäure, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukt sowie Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial sowie besagte Nukleinsäuren, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte.

Den verschiedenen Aspekten der vorliegenden Erfindung ist gemein, dass die daran beteiligten Prozesse mit der (Ent-)Differenzierung von Zellen einherzugehen scheinen, die in verschiedenen medizinischen Anwendungen in nutzbringender Weise verwendet werden können. Besonders betroffen sind dabei das Blutgefäßsystem von Wirbeltieren, insbesondere von Säugtieren und dem Menschen, und die Haut derselben.

Das Blutgefäßsystem des Menschen besteht aus Arterien, Arteriolen, Blutkapillaren, Endstrombahnen, Venolen und Venen. Arterien sind Gefäße mit vom Herzen begleitender Strömungsrichtung des Bluts, wobei zwei Typen unterschieden werden: Arterien des muskulären Typs und Arterien des elastischen Typs, wobei letztere große herznahe Arterien darstellen. Arterien sind generell aufgebaut aus einer Tunica interna, die auch als Intima bezeichnet wird, mit einschichtigem, dem Lumen zugewandten Endothel, dem lockerem bindegewebigen Stratum subendotheliale und der Membrana elastica interna, die beim muskulären Typ deutlich ausgeprägt ist, weiterhin der Tunica media, die beim muskulären Typ aus dichtgefügteten Lagen ring- oder schraubenförmig angeordneter glatter Muskelzellen und feinen elastischen und kollagenen Fasern besteht, beim elastischen Typ dagegen aus zahlreichen gefensterten elastischen Membranen und eingelagerten glatten Muskelzellen sowie Kollagenfasern und der Tunica externa, die aus kollagenem Bindegewebe und elastischen Fasern besteht und ernährende

Gefäße sowie Gefäßnerven enthält. Zwischen der Tunica media und der Tunica externa kann eine Membrana elastica externa ausgebildet sein.

Als letzte Gefäßabschnitte der Arterien schließen sich Arteriolen an, die ein Endothel, ein Gitterfasernetz und eine einschichtige durchgehende glatte Muskelzellschicht besitzen, wobei die in Arterien noch vorhandene Membrana elastica interna fehlt, so dass myoendotheliale Kontakte entstehen.

Die Arteriolen gehen dann in Blutkapillaren über, kleine Gefäße mit einem Durchmesser von 6 bis ungefähr 20 bis 30 μm . Die Wand von Blutkapillargefäßen besteht aus einem Endothel, das einer von Gitterfasern umspannenden Basalmembran innen aufsitzt. Dieser Basalmembran liegen außen verzweigte Zellen, sogenannte Pericyten, an. Die Pericyten sind wahrscheinlich am Stoffaustausch zwischen dem Kapillarblut und dem Gewebe beteiligt.

Die Blutkapillaren gehen dann in Venolen und letztlich in Venen über, also Blutgefäße mit zum Herzen führender Strömungsrichtung des Blutes. Die Wand typischer Venen enthält eine Tunica interna mit vielen elastischen Fasern, jedoch keine Membrana elastica interna, weiterhin eine Tunica media mit lockergefügten Bündeln glatter Muskulatur sowie eine Tunica externa. Im Gegensatz zu Arterien erscheint die Begrenzung dieser Schichten im histologischen Präparat unscharf.

Der aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen bestehende, die Mikrozirkulation des Blutes bestimmende Abschnitt des Gefäßsystems wird Endstrombahn genannt und stellt in hämodynamischer Hinsicht den neutralen Bereich zwischen arteriellem Zufluss und venösem Abfluss des Blutes, also den Wendepunkt des Kreislaufs dar. In diesem Bereich finden Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe sowie die Aufrechterhaltung des thermalen und Ionenmilieus statt.

Die Haut ist ein wichtiges Organ des Säugetierorganismus, insbesondere auch des Menschen. Die Haut besteht aus der Haut im engeren Sinne, d. h. der Cutis, an der sich die Oberhaut oder Epidermis und die Lederhaut, auch als Dermis oder Korium bezeichnet, anschließen sowie daran befindliche Anhangsgebilde wie Haare, Nägel und Drüsen, sowie als Hautelement im weiten Sinne die Unterhaut oder Subcutis. Die von der Haut wahrgenommenen Funktionen sind

ausgesprochen vielfältig. So dient sie als mechanische Abgrenzung gegen die Umwelt, als Wärmeschutzorgan, das durch seine Überschussdurchblutung im Dienste der Blutverteilung und der Temperaturregelung wirksam ist, aber auch durch Isolatorwirkung des Haarkleides und des Fettpolsters sowie durch Verdunstung von Schweiß, womit sie gleichzeitig an der Regulation des Wasserhaushaltes beteiligt ist, als Schutzorgan gegen Bakterien infolge ihres Säureschutzmantels sowie gegen Strahlen infolge Pigmentbildung, und als Energiespeicher bedingt durch das Fettdepot. Darüber hinaus ist die Haut durch die in ihr befindlichen Nervenendorgane ein wichtiges Sinnesorgan. Weiterhin ist sie ein Immunorgan mit differenter Abwehrfunktion. Infolgedessen erfährt die Haut vielfältige Aufmerksamkeit, insbesondere im Rahmen der Wundheilung sowie der Hautalterung.

Die Wundheilung ist ein dynamischer Prozess mit komplexer Wechselwirkung zwischen Zellen, extrazellulärer Matrix, Plasmaproteinen und einer kontrollierten Angiogenese, die durch eine Reihe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren koordiniert ist. Unabhängig von der Art der Wunde und dem Ausmaß des Gewebeverlustes lässt sich die Wundheilung grob in die sich zeitlich überlappenden Phasen der inflammatorischen bzw. exsudativen Phase, der proliferativen Phase sowie der Differenzierungs- und Umbauphase einteilen. Die Phaseneinteilung orientiert sich aber an den grundsätzlichen morphologischen Veränderungen im Laufe der Reparatursprozesse, ohne die eigentlich Komplexität der Vorgänge widerzuspiegeln.

Der Prozess der Wundheilung lässt sich quantitativ in eine primäre und sekundäre Wundheilung einteilen, wobei um der therapeutischen Problematik, die sich aus dem Umfang und der Art der Gewebeerstörung ergibt, Rechnung zu tragen, weiter in die verzögerte Primärheilung sowie den chronischen Wundverlauf unterschieden wird. Eine primäre Wundheilung ist zum Beispiel bei glatten, dicht aneinanderliegenden Wundflächen einer Schnittwunde ohne nennenswerten Substanzverlust und ohne Einlagerung von Fremdkörpern in einem gut mit Blutgefäßen versorgten Gewebe der Fall. Eine primäre Wundheilung ist üblicherweise bei chirurgisch gesetzten Wunden oder bei Gelegenheitswunden durch scharfkantige Gegenstände gegeben. Ist aufgrund der Wundentstehung mit einer Infektion zu rechnen, tritt die verzögerte Primärheilung ein. Manifestiert sich eine Infektion, so wird die Wunde als sekundärheilend eingestuft. Eine Sekundärheilung ist bei größeren Defekten, bei denen ein Granulationsgewebe aufgebaut werden muss oder wenn eine Infektion die direkte Vereinigung der Wundränder nicht zulässt, gegeben. Ist die Heilung einer Wunde nicht innerhalb von acht Wochen abgeschlossen, so spricht man von

einem chronischen Heilungsverlauf. Eine chronische Wunde kann in jeder Wundheilungsphase entstehen und entwickelt sich meistens aus fortschreitender Gewebeerstörung infolge von Gewebeerkrankungen unterschiedlicher Genese, lokalen Druckschäden, Strahlenschäden oder Tumoren.

Eine weitere Unterscheidung der Wundheilung kann basieren auf der Unterscheidung in akute Wunden und chronische Wunden. Zu den akuten Wunden zählen die akuten traumatisch bedingten Wunden bis hin zu komplexen traumatischen Defekten, die thermischen und chemischen Verletzungen/Verbrennungen und Inzisionen/OP-Wunden.

Bei akuten traumatisch bedingten Wunden erfolgt für den Fall, dass sich die Wundränder spannungsfrei adaptieren lassen, gegebenenfalls nach erfolgter Wundexzision, ein primärer Wundverschluss durch Naht, Klammern oder Wundnahtstreifen. Bei Wunden, die eine potentielle Infektionsgefährdung aufweisen, wird die Wunde dagegen zunächst mit sterilen feuchten Verbänden offen gehalten, bis eine Infektion ausgeschlossen werden kann. Bei sekundär heilenden und komplexeren Wunden ist der Wundverschluss wesentlich vielschichtiger.

Bei thermischen und chemischen Wunden, d. h. solchen, die durch Einwirkung von Hitze und Kälte oder gewebeschädigenden Strahlen, Säuren oder Laugen entstehen, erfolgt die Behandlung entsprechend dem Schädigungsmuster. Bei schwer verbrannten Patienten erfolgt zum Beispiel zunächst eine Nekrektomie mit einem anschließenden chirurgischen Ersatz durch ein Hauttransplantat. Dabei werden für den Fall, dass die Wunde nicht transplantierbar ist oder durch die ausgedehnten Verbrennungen nicht mehr genügend Spenderstellen zur Verfügung stehen, sogenannte Allo- und Xenotransplantate verwendet. Bei ausreichend vorhandenen Spenderarealen kann auf permanente autologe Hauttransplantation zurückgegriffen werden. Eine Sonderform ist dabei die autologe Keratinocyten-Transplantation.

Chronische Wunden sind sekundär heilende Wunden, die trotz kausaler und sachgerechter lokaler Therapie innerhalb von acht Wochen nicht abheilen. Obgleich sich chronische Wunden jederzeit aus einer akuten Wunde entwickeln können, stellen die überwiegenden Fälle von chronischen Wunden das letzte Stadium einer fortschreitenden Gewebeerstörung dar, die ausgelöst wird durch venöse, arterielle oder stoffwechselbedingte Gefäßleiden,

Druckschädigungen, Strahlenschäden oder Tumoren. Die verschiedenen Typen chronischer Wunden werden durch unterschiedliche Pathologien hervorgerufen, wobei die Wunden biochemisch betrachte als ähnlich gelten. Zu den lokalen Faktoren, die die Wundheilung beeinträchtigen, zählen unter anderem Fremdkörper, Ischämie, wiederholte Traumata und Infektionen. Des Weiteren können systemische Faktoren wie beispielsweise erhöhtes Alter, Unter- und Fehlernährung, Diabetes sowie Nierenerkrankungen einen Einfluss auf die Wundheilung haben. Zu den volkswirtschaftlich relevantesten chronischen Wundheilungsstörungen zählen, unter anderem, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, das diabetische Ulcus, das Dekubitalulcus und die chronische posttraumatische Wunde.

Neben akuten und chronischen Wunden tritt als wesentliche Veränderung der Haut die Hautalterung auf, die grundsätzlich in das Zeitaltern und das Umweltaltern unterteilt werden kann. Der Begriff Zeitaltern beschreibt die auf die normalen Alterungsvorgänge der Haut bezogenen Veränderungen, die zu einer Verdünnung der Schichten der Haut und zu einem Nachlassen der Funktionen der Hautdrüsen führen. Dies bedingt mit zunehmendem Alter eine dünne, trockene, feinrunzelige Haut. Altersbedingte Fältchen und Falten sind die Folge einer Abnahme bzw. eines Verlustes des Kollagens und der elastischen Fasern in der Lederhaut. Des Weiteren wird die Integrität von gealterter Haut leichter unterbrochen und diese regeneriert langsamer, so dass der Organismus einem größeren Infektionsrisiko ausgesetzt ist. Eine altersbedingte Verlangsamung und Verminderung der Zellerneuerung wird unter anderem durch hormonelle Veränderungen und erbliche Faktoren beeinflusst. Umwelteinflüsse haben jedoch einen entscheidenden Einfluss auf diesen Alterungsprozess, den sie beschleunigen und verstärken können.

Bei der Umweltalterung kommt insbesondere dem Ausmaß an lebenslanger UV-Strahlung eine große Bedeutung zu, so dass man hier auch von „photoaging“ spricht. Aber auch andere Faktoren, wie eine eingeschränkte Durchblutung der Haut durch Nikotinabusus, begünstigt die Alterungsvorgänge. Während der UV-B-Anteil des Sonnenlichts in erster Linie Schäden an den Zellen der Oberhaut auslöst und damit zu Hautkrebsvorstufen (sog. aktinischen Keratosen) und Hautkrebs (Basalzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome, Melanome) führt, dringen UV-A-Strahlen bis in die Lederhaut und zerstören hier das ansässige Hautbindegewebe (Elastose). Dies führt im Gesicht, aber auch im Nacken zu einer schlaffen, stark runzeligen, in grobe Falten gelegten Haut. Eine weitere Folge einer Dauer-UV-Belastung sind die sog. Altersflecken, die

bevorzugt an lichtexponierten Stellen wie im Gesicht und an den Handrücken auftreten. Im Gegensatz zu dieser Hyperpigmentierung kann der Lichteinfluss auch zu Depigmentierung (Hypomelanosis guttata) führen. Zusammenfassend werden diese Phänomene als chronischer Lichtschaden bezeichnet, der als ein irreversibler Prozess eingestuft wird.

Die Behandlung der verschiedenen Wunden kann grundsätzlich in eine passive und eine aktive Wundtherapie eingeteilt werden. Als Sonderform können auch sog. Hautersatzverfahren verwendet werden. Bei der passiven Wundtherapie werden zum einen inaktive, textile Verbandstoffe verwendet, die als reines Abdeckungsmaterial dem Infektionsschutz dienen. Interaktive Wundauflagen dienen im Unterschied zu den inaktiven Verbandstoffen häufig dazu, ein feuchtes Wundmilieu zu schaffen und damit den Heilungsprozess zu beschleunigen. Dabei werden, unter anderem, Hydrokolloide, Hydrogele, Hydropolymere und Schaumverbände sowie Kalziumalginat verwendet. Der Nachteil dieser passiven Wundtherapie liegt darin, dass das Verbandsmaterial die aktive Heilung von Problemwunden nicht befördert, insbesondere bei chronischen Wunden, die häufig als therapieresistent gelten.

Im Stand der Technik sind verschiedene Wachstumsfaktoren beschrieben, die im Rahmen der Angiogenese und/oder der aktiven Wundtherapie verwendet werden und die an einzelnen Zielmolekülen der Wundheilung angreifen. Dazu zählen, unter anderem, VEGF, transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF beta), von Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Interleukin 1 beta, Granulozyten-Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Gerinnungsfaktor XIII. Die in diese Verbindungen gesetzten Hoffnungen wurden jedoch oftmals nicht erfüllt, was zumindest zum Teil in der Komplexität des Wundheilungsprozesses begründet liegt.

Bei den Hautersatzverfahren zur Abdeckung von Wunden wird zwischen temporärem und permanentem Hautersatz unterschieden. Der temporäre Hautersatz kann entweder allogenem biologischen Ursprungs sein, beispielsweise Fremdhaut wie dezellulierte humane Leichenlederhaut in Kombination mit Keratinocyten sheets oder Spalthaut, xenogen biologischen Ursprungs sein, beispielsweise equine Kollagenfibrillen oder bovine Kollagenschwämme, oder eine Kombination aus synthetischem und biologischem Material darstellen, wie beispielsweise Folien aus Silikon oder Nylon kombiniert mit Kollagenmatrizes und/oder Fibroblasten. Der

permanente Hautersatz kann dabei ein autologes Hauttransplantat sein oder auf Zellkulturen zurückgehen.

Infolge der unterschiedlichen physiologischen Vorgänge bei der Wundheilung einerseits und Hautalterung andererseits werden zur Bekämpfung der Hautalterung durch sog. Anti-Aging-Produkte andere therapeutische bzw. kosmetische Ansätze verfolgt. Nach einer Studie der Stiftung Warentest (test Spezial Kosmetik 2002, Seite 17-19, Sonderheft) weisen die meisten auf dem Markt erhältlichen Präparate keine oder nur eine geringe Effizienz auf, insbesondere was die Glättung der Falten anbelangt. Dabei sind bei Anti-Aging-Produkte faktisch nur jene Strategien wirksam, die auf eine Verlangsamung der Alterungsprozesse abzielen. Entsprechend werden Vitamine und Antioxidanzien eingesetzt, um die Haut vor externen, umweltbedingten Faktoren, wie zum Beispiel UV-B-Strahlung oder Luftverschmutzung, zu schützen. Daneben wird den Falten und anderen kleineren Hautfehlern durch kosmetischen Operationen entgegengewirkt. Dies ist jedoch mit einem nicht unerheblichen apparativen Aufwand verbunden. Eine weitere Technik, die derzeit zur Beseitigung von Falten angewandt wird, ist die Injektion von Botulintoxin. Botulintoxin führt, in die Bereiche der Falten der Haut injiziert, zu einer Vergiftung und somit zur Lähmung der Muskelzellen, wodurch insgesamt eine Straffung der Haut erreicht wird. Neben den ungeklärten Nebenwirkungen dieser Behandlung ist ein weiterer Nachteil der, dass bei etwa 5 % der Patienten mit der Zeit die Therapie in Folge neutralisierender Antikörper nicht mehr anspricht.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, um Angiogenese oder Neovaskularisierung zu fördern oder zu inhibieren oder transmyokardiale Revaskularisierung zu fördern und die damit im Zusammenhang stehenden Erkrankungen behandelbar zu machen. In einem weiteren Aspekt liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zur Förderung bzw. Initiierung der Wundheilung bereitzustellen.

Der vorliegenden Erfindung liegt weiterhin die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, um Zellen, insbesondere mesenchymale Zellen, aber auch epitheliale Zellen, in einen Zustand zu überführen, der diesen erlaubt, sich zu differenzieren, ggf. sich zu dedifferenzieren und/oder zu wachsen. In einem weiteren Aspekt liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zur Förderung bzw. Initiierung der Wundheilung bereitzustellen. Schließlich ist es eine

der Aufgaben der vorliegenden Erfindung ein Mittel bereitzustellen, welches der Hautalterung entgegenwirkt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem ersten Aspekt durch die Verwendung, insbesondere in vitro, einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung, Wundheilung, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group Protein umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem zweiten Aspekt durch die Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die mit mangelnder oder übermäßiger Angiogenese oder Neovaskularisierung oder mit Wundheilung im Zusammenhang steht oder transmyokardiale Revaskularisierung erforderlich macht,

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group Protein umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem dritten Aspekt, der bevorzugterweise eine Ausführungsform des ersten und zweiten Aspektes der vorliegenden Erfindung ist, durch die Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung und/oder Prävention einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die diabetische Retinopathie, proliferative Retinopathia diabetica, diabetische Nephropathie, Makuladegeneration, Arthritis, Endometriose, Pannus, Histiozytosen, Psoriasis, Rosacea, Besenreiserarzen, eruptives Hämangiom, Tumorerkrankungen, kavernöses Hämangiom, Lippenangiom, Hämangiosarkom, Hämorrhoiden, Arteriosklerose, Angina pectoris, Ischämie, Infarkt, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanom, Kaposi-Sarkom, Tumore,

Gestose, Unfruchtbarkeit, akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden, OP-Wunden und chronische Wunden umfasst.

In einer Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass die chronische Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Decubitus, Ulcus cruris, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetischen Ulcus, Decubitalulcus, chronische posttraumatische Wunde und diabetischer Fuß umfasst.

In einer Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die die HMGA-Familie, die HMGB-Familie und die HMGN-Familie umfasst.

In einer Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGB1, HMGB2 und HMGB3 umfasst.

In einer bevorzugteren Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein HMGB1 ist.

In einer Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein aus der HMGA-Familie ausgewählt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c und HMGA2 umfasst.

In einer bevorzugteren Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein HMGA1a ist.

In einer Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass ein High Mobility Group Protein aus der HMGA-Familie ausgewählt ist, und ein zweites High Mobility Group Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist, wobei das Protein aus der HMGBA-Familie bevorzugterweise HMGA1a und das Protein aus der HMGB-Familie bevorzugterweise HMGB1 ist.

In einer Ausführungsform des ersten bis dritten Aspektes ist vorgesehen, dass zusätzlich VEGF oder eine dafür codierende Nukleinsäure verwendet wird.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem vierten Aspekt durch ein Verfahren zur Beeinflussung der Angiogenese oder Neovaskularisierung oder der Wundheilung von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,
- b) Zugabe einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) und
- c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en),

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, und optional

- d) Erhalten oder Wiedergewinnen des Gewebes oder einer Zwischenstufe davon.

In einer Ausführungsform des vierten Aspektes ist vorgesehen, dass das Gewebe oder ein Teil davon mit VEGF und/oder einer dafür codierenden Nukleinsäure inkubiert wird.

In einer Ausführungsform des vierten Aspektes ist vorgesehen, dass es ein *in vitro*-Verfahren ist.

In einer Ausführungsform des vierten Aspektes ist vorgesehen, dass das Gewebe explantiertes Gewebe oder *in vitro* gezüchtetes Gewebe ist.

In einer Ausführungsform des vierten Aspektes ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

In einer Ausführungsform des vierten Aspektes ist vorgesehen, dass zwei oder mehrere der HMGB-Proteine oder der dafür codierenden Nukleinsäuren verwendet werden, wobei bevorzugterweise ein High Mobility Group-Protein aus der HMGBA-Familie ausgewählt ist, und ein zweites High Mobility Group-Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist, wobei das Protein aus der HMGBA-Familie bevorzugterweise HMGA1a und das Protein aus der HMGB-Familie bevorzugterweise HMGB1 ist.

In einer Ausführungsform des ersten bis vierten Aspektes ist vorgesehen, dass zusätzlich zu der/den Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en), wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt oder Translationsprodukt verwendet wird, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für Vascular Endothelial Growth Factor umfasst

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem fünften Aspekt durch eine pharmazeutische Formulierung umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wie hierin offenbart, und einen pharmazeutisch geeigneten Träger.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem sechsten Aspekt durch ein Trägermaterial umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie hierin offenbart.

In einer Ausführungsform des sechsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Trägermaterial aus einem Material besteht, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Zellulose, Agarose, Kollagen, Silikon, Silicium, Kunststoffe, Gele, Hydrogele, Matrices basierend auf Fibrin, Kustseidenfasern, Hydrokolloide, Lipokolloide, Polyurethan, Polyurethanharz, Gips,

synthetische Biomaterialien, thermoplastische Kunststoffe, Zinkleim, Polsterschaum, Polyisobutylen, Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika und Feuchthaltemittel umfasst.

In einer Ausführungsform des sechsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Trägermaterial als Implantat oder zur Wundheilung dient.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem siebten Aspekt durch ein Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial und eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie hierin offenbart.

In einer Ausführungsform des siebten Aspektes ist vorgesehen, dass das Deckmaterial aus der Gruppe ausgewählt ist, die Hydrokolloid-Verbände, Calciumalginat-Verbände, Aktivkohlekompressen/auflagen, Schaumstoffwundauflagen, Folienverbände, Transparentverbände, Silikonschaumverbände, Vliesstoffwundauflagen, Hydrozelluläre Wundverbände, Hydroselektive Wundauflagen, Absorbierende Wundkissen, Sprühverbände, Kunstseidengaze, Baumwollgaze, Paraffingazeverbände, silberbeschichtete Wundverbände und Hydropolymer-/Schaumverbände umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem achten Aspekt durch eine Formulierung umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie hierin offenbart, und eine Trägerphase, wobei die Trägerphase bevorzugterweise aus der Gruppe ausgewählt ist, die Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogele, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem neunten Aspekt durch ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der

Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem verursachten Reaktion.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem zehnten Aspekt durch ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung;
- c) Testen der Referenzverbindung im Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung;
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion; und
- f) Vergleich der Reaktion von der Referenz-Verbindung im Testsystem mit der Reaktion von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem elften Aspekt durch ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der

Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Vaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung, wobei die Referenz-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen der Kandidaten-Verbindung; und
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Referenz-Verbindung bestimmt wird.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem zwölften Aspekt durch ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Vaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung, wobei die Kandidaten-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung; und

e) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird.

In einer Ausführungsform des neunten bis zwölften Aspektes ist vorgesehen, dass das Testsystem ein *in vitro* Testsystem oder ein *in vivo* Testsystem ist.

In einer Ausführungsform des neunten bis zwölften Aspektes ist vorgesehen, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Förderung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Förderung des Prozesses ist, wenn die Reaktion der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem gleich oder stärker ist als die Reaktion der Referenz-Verbindung.

In einer Ausführungsform des neunten bis zwölften Aspektes ist vorgesehen, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Inhibierung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zum Inhibieren des Prozesses ist, wenn die von der Kandidaten-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems eine geringere Reaktion ist als die von der Referenz-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems.

In einer Ausführungsform des neunten bis zwölften Aspektes ist vorgesehen, dass die Referenz-Verbindung eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) umfasst, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, insbesondere wie hierin offenbart.

In einer bevorzugten Ausführungsform des neunten bis zwölften Aspektes ist vorgesehen, dass der Prozess die Inhibierung der Angiogenese ist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem dreizehnten Aspekt durch die Verwendung eines Verfahrens nach einem der Aspekte neun bis zwölf zum Screenen einer Verbindung zur Behandlung und/oder Prävention einer Erkrankung, wobei das bereitgestellte Testsystem ein Testsystem für die jeweilige Krankheit ist.

In einer Ausführungsform des dreizehnten Aspektes ist vorgesehen, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die solche Krankheiten umfasst, die Förderung oder Inhibierung von Angiogenese oder Neovaskularisierung erforderlich machen oder transmyokardiale Revaskularisierung oder Wundheilung erforderlich machen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des dreizehnten Aspektes ist vorgesehen, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die diabetische Retinopathie, proliferative Retinopathia diabetica, diabetische Nephropathie, Makuladegeneration, Arthritis, Endometriose, Psoriasis, Rosacea, Besenreizevarizen, eruptives Hämangiom, kavernöses Hämangiom, Lippenangiom, Hämangiosarkom, Hämorrhoiden, Artherosklerose, Angina pectoris, Ischämie, Infarkt, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanom, Kaposi-Sarkom, Tumore, Gestose, Unfruchtbarkeit, akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden, OP-Wunden und chronische Wunden umfasst.

In einer bevorzugten Ausführungsform des dreizehnten Aspektes ist vorgesehen, dass die Erkrankung eine Tumorerkrankung ist, wobei bevorzugterweise die Tumorerkrankung nekrotische Zellen, bevorzugterweise nekrotische Tumorzellen aufweist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem vierzehnten Aspekt durch eine Verbindung erhältlich nach einem Verfahren nach dem neunten bis zwölften Aspekt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem fünfzehnten Aspekt durch die Verwendung einer Verbindung gemäß dem vierzehnten Aspekt zur Herstellung eines Medikamentes, bevorzugterweise zur Behandlung und/oder Prävention einer Krankheit, wie hierin offenbart.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem sechszehnten Aspekt durch die Verwendung, insbesondere in vitro, einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem siebzehnten Aspekt durch die Verwendung, insbesondere in vitro, einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Entdifferenzierung von Zellen und Reprogrammierung von Zellen umfasst, für Gewebeaufbau und/oder Geweberegeneration, insbesondere beruhend auf der Grundlage einer Entdifferenzierung und/oder Differenzierung des aufzubauenden oder zu regenerierenden Gewebes,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem achtzehnten Aspekt durch die Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die Krankheiten, die die Reparatur von DNA-Schäden erforderlich machen, Krankheiten, die die Geweberegeneration erforderlich machen, Krankheiten, die die Wundheilung erforderlich machen, die mit Gewebeeralterung einhergeht, Krankheiten, die Zahn- und Knochenimplantate erforderlich machen, Krankheiten, die mit Gewebeeralterung einhergehen, Wundheilungsstörung, Hauterkrankungen, Xeroderma pigmentosum, Lederhaut, Hautkrebs, Hautkrebs nach Sonnenbrand, Hautalterung nach Sonnenbrand, Sonnenbrand und Herzinfarkt umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem neunzehnten Aspekt durch die Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt zur Herstellung eines kosmetischen Produktes, bevorzugterweise eines kosmetischen Produktes für die Geweberegeneration, Wundheilung, Prävention von Lederhaut, Prävention von Hautkrebs,

insbesondere Hautkrebs nach Sonnenbrand, Hautalterung, insbesondere Hautalterung nach Sonnenbrand, Gewebealterungsverhinderung und/oder Gewebeverjüngung,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-Protein umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem zwanzigsten Aspekt durch die Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für die Herstellung eines Medikamentes Prävention und/oder Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die Hauterkrankungen, Xeroderma pigmentosum, Lederhaut, Hautkrebs, Hautkrebs nach Sonnenbrand, Sonnenbrand, akute Wunden und chronische Wunden umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

In einer Ausführungsform des zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die akute Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden und OP-Wunden umfasst.

In einer Ausführungsform des zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die chronische Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Decubitus, Ulcus cruris, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetische Ulcus, Decubitalulcus, chronische posttraumatische Wunde und diabetischer Fuß umfasst.

In einer Ausführungsform des sechszehnten bis zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das basische DNA-bindende Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die High Mobility Group-Proteine umfasst.

In einer Ausführungsform des sechszehnten bis zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA, HMGB und HMGN umfasst.

In einer Ausführungsform des sechszehnten bis zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein ein Protein der HMGA-Familie ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform des sechszehnten bis zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA1a, HMGA1b und HMGA2 umfasst.

In einer Ausführungsform des sechszehnten bis zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuren, die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO. 31 bis SEQ ID NO. 64 und deren jeweiligen Derivate umfasst.

In einer Ausführungsform des sechszehnten bis zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Translationsprodukt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Polypeptide mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 30 und deren jeweilige Derivate umfasst.

In einer bevorzugten Ausführungsform des sechszehnten bis zwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Protein eine Modifikation aufweist, wobei die Modifikation aus der Gruppe ausgewählt ist, die Phosphorylierung und Acetylierung umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem einundzwanzigsten Aspekt durch ein Verfahren zur Regeneration von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt und
- c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst, und optional

d) Erhalten oder Wiedergewinnen des regenerierten Gewebes oder einer Zwischenstufe davon.

In einer Ausführungsform des einundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Verfahren ein in vitro-Verfahren ist.

In einer Ausführungsform des einundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das zu regenerierende Gewebe verschieden oder identisch ist von dem in Schritt a) bereitgestellten Gewebe.

In einer Ausführungsform des einundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das zu regenerierende Gewebe und/oder das in Schritt a) bereitgestellte Gewebe unabhängig voneinander ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Hautgewebe, Fettgewebe, Knorpelgewebe, Muskelgewebe, Zellen des Blutes und des Blutbildes und Nervenzellen umfasst.

In einer Ausführungsform des einundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie hierin offenbart.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem zweiundzwanzigsten Aspekt durch ein Verfahren zur Entdifferenzierung und/oder Reprogrammierung von Zellen umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen einer oder mehrerer Zellen,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, und
- c) Inkubieren der Zelle und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

In einer Ausführungsform des zweiundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Verfahren ein in vitro-Verfahren ist.

In einer Ausführungsform des zweiundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Verfahren weiterhin den Schritt umfasst:

d) Erhalten einer entdifferenzierten und/oder reprogrammierten Zelle.

In einer Ausführungsform des zweiundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die entdifferenzierte Zelle(n) und/oder reprogrammierte Zelle(n) und/oder die gemäß Schritt a) bereitgestellte(n) Zelle(n) unabhängig voneinander ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Zellen der Epidermis, Zellen der Haut, Zellen des Fettgewebes, Zellen des Knorpelgewebes, Zellen des Muskelgewebes, Zellen des Blutes, Zellen des blutbildenden Gewebes und Nervenzellen umfasst.

In einer Ausführungsform des zweiundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie hierin offenbart.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem dreiundzwanzigsten Aspekt durch eine pharmazeutische Formulierung umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wie hierin offenbart, und einen pharmazeutisch geeigneten Träger.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem vierundzwanzigsten Aspekt durch ein Trägermaterial umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie hierin offenbart.

In einer Ausführungsform des vierundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Trägermaterial aus einem Material besteht, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Zellulose, Agarose, Kollagen, Silikon, Silicium, Kunststoffe, Gele, Hydrogele, Matrices basierend auf

Fibrin, Kustseidenfasern, Hydrokolloide, Lipokolloide, Polyurethan, Polyurethanharz, Gips, synthetische Biomaterialien, thermoplastische Kunststoffe, Zinkleim, Polsterschaum, Polyisobutylen, Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika und Feuchthaltemittel umfasst.

In einer Ausführungsform des vierundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Trägermaterial als Implantat oder zur Wundheilung dient.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem fünfundzwanzigsten Aspekt durch ein Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial und eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie hierin offenbart.

In einer Ausführungsform des fünfundzwanzigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Deckmaterial aus der Gruppe ausgewählt ist, die Hydrokolloid-Verbände, Calciumalginat-Verbände, Aktivkohlekompressen/auflagen, Schaumstoffwundauflagen, Folienverbände, Transparentverbände, Silikonschaumverbände, Vliesstoffwundauflagen, hydrozelluläre Wundverbände, Hydroselektive Wundauflagen, absorbierende Wundkissen, Sprühverbände, Kunstseidengaze, Baumwollgaze, Paraffingazeverbände, silberbeschichtete Wundverbände und Hydropolymer-/Schaumverbände umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem sechsundzwanzigsten Aspekt durch eine kosmetische Formulierung umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie hierin offenbart, und eine Trägerphase, wobei die Trägerphase bevorzugterweise aus der Gruppe ausgewählt ist, die Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogele, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem siebenundzwanzigsten Aspekt durch ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses,

wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem verursachten Reaktion.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem achtundzwanzigsten Aspekt durch ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung;
- c) Testen der Referenzverbindung im Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung;
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion; und

- f) Vergleich der Reaktion von der Referenz-Verbindung im Testsystem mit der Reaktion von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem neunundzwanzigsten Aspekt durch ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung, wobei die Referenz-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen der Kandidaten-Verbindung; und
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Referenz-Verbindung bestimmt wird.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem dreißigsten Aspekt durch ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung, wobei die Kandidaten-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung; und
- e) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird.

In einer Ausführungsform des siebenundzwanzigsten bis dreißigsten Aspektes ist vorgesehen, dass das Testsystem ein *in vitro* Testsystem oder ein *in vivo* Testsystem ist.

In einer Ausführungsform des siebenundzwanzigsten bis dreißigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Förderung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Förderung des Prozesses ist, wenn die Reaktion der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem gleich oder stärker ist als die Reaktion der Referenz-Verbindung.

In einer Ausführungsform des siebenundzwanzigsten bis dreißigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Inhibierung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zum Inhibieren des Prozesses ist, wenn die von der Kandidaten-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems eine geringere Reaktion ist als die von der Referenz-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems.

In einer Ausführungsform des siebenundzwanzigsten bis dreißigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die Referenz-Verbindung eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren

Translationsprodukt ist, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindenden Proteine umfasst, insbesondere wie hierin offenbart.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem einunddreißigsten Aspekt durch die Verwendung eines Verfahrens gemäß dem siebenundzwanzigsten bis dreißigsten Aspekt zum Screenen einer Verbindung zur Behandlung und/oder Prävention einer Erkrankung, wobei das bereitgestellte Testsystem ein Testsystem für die jeweilige Krankheit ist.

In einer Ausführungsform des einunddreißigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die die Reparatur von DNA-Schäden erforderlich macht, die Geweberegeneration erforderlich macht, die Wundheilung erforderlich macht, die Zahn- und Knochenimplantate erforderlich macht, die mit Gewebealterung einhergeht, Wundheilungsstörung, Hauterkrankungen, Xeroderma pigmentosum, Lederhaut, Hautkrebs, Hautkrebs nach Sonnenbrand, Hautalterung nach Sonnenbrand, Sonnenbrand und Herzinfarkt umfasst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem zweiunddreißigsten Aspekt durch ein Sonnenschutzmittel umfassend zumindest eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-Proteine umfasst.

In einer Ausführungsform des zweiunddreißigsten Aspektes ist vorgesehen, dass die basischen DNA-Proteine HMG-Proteine, insbesondere solche sind, wie sie hierin offenbart sind.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem dreiunddreißigsten Aspekt durch eine Verbindung erhältlich nach einem Verfahren gemäß dem siebenundzwanzigsten bis dreißigsten Aspekt oder einer Verwendung nach dem einunddreißigsten Aspekt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem vierunddreißigsten Aspekt durch die Verwendung einer Verbindung gemäß dem dreiunddreißigsten Aspekt zur Herstellung eines Medikamentes, bevorzugterweise zur Behandlung und/oder Prävention einer Krankheit, wie hierin offenbart.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst in einem fünfunddreißigsten Aspekt durch ein Verfahren zur Behandlung eines Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass dem Organismus eine wirksame Menge eines DNA-bindenden Proteins, eines HMG-Proteins, einer dafür codierenden Nukleinsäure oder eines Transkriptionsproduktes und/oder eines Translationsproduktes, einer damit wechselwirkenden funktionalen Nukleinsäure, eines damit wechselwirkenden Peptides oder Antikörpers und/oder eine Verbindung gemäß dem dreiunddreißigsten Aspekt verabreicht wird.

In einer Ausführungsform des fünfunddreißigsten Aspektes ist vorgesehen, dass der Organismus an einer Krankheit leidet oder die Möglichkeit besteht an dieser Krankheit zu leiden oder zu erkranken und die Krankheit bevorzugterweise eine solche ist, wie hierin offenbart.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe auch durch den Gegenstand der beigefügten unabhängigen Ansprüche gelöst, wobei sich besonders bevorzugte Ausführungsformen aus den Unteransprüchen ergeben.

Entsprechend dem Aspekt der vorliegenden Erfindung betreffend das erfindungsgemäßen Sonnenschutzmittel ist in einer Ausführungsform vorgesehen, dass es sich dabei um ein solches Mittel handelt, das durch Reflexion oder Absorption von Strahlung die Haut vor der schädigenden Einwirkung intensiver Sonnenstrahlung mit der Folge von Sonnenbrand bzw. Erythemen schützt. Das erfindungsgemäße Mittel kann dabei in Form von wässrigen, alkoholischen, öligen Lösungen, Emulsionen und Lotionen, Cremen, Fettstiften, Gelen, Aerosol-Schaumcremes und weiteren, den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannten Formen vorliegen. Neben den hierin beschriebenen basischen DNA-bindenden Proteinen bzw. der dafür codierenden Nukleinsäure(n) können die erfindungsgemäßen Sonnenschutzmittel absorbierenden Lichtschutzstoffe und/oder reflektierende Verbindungen enthalten. Reflektierende Verbindungen sind insbesondere anorganische Substanzen, wie beispielsweise Zinkoxid, Eisenoxid, Titandioxid oder Calciumcarbonat. Lichtschutzstoffe, auch als Lichtfilter oder UV-Absorber bezeichnet, wirken im Allgemeinen so, dass die UV-Strahlung durch strahlungslose Desaktivierung in unschädliche Wärme umgewandelt wird. Bevorzugt sind dabei eine oder mehrere der folgenden Verbindungen bzw. Verbindungsgruppen: Benzophenon-Derivate, Hydroxynaphthochinone, Phenylbenzoxazole und Phenylbenzimidazole, Digalloyltrioléat, Aminobenzoessäureester, Salicylsäureester, alicyclische Dienone, Zinksäureester, Benzalazin,

aromatische Harnstoffderivate, Sulfonamide, Cumarinderivate oder Phenylglyoxylsäure-Derivate. Weitere Bestandteile können sein Nerz-, Avocado-, Mandel-, Sesam-, Erdnuss-, Oliven-, Saflor-, und/oder Kokosöl sowie Urocansäure. Zusätzliche Bestandteile können, unter anderem, Dihydroxiaceton, Carotin, Walnuss-Schalen-Extrakt und weitere Verbindungen sein, die insbesondere geeignet sind, die Hautbräunung zu fördern.

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass basische DNA-bindende Proteine wie die HMG-Proteine dazu führen, eine Zelle in einen Zustand zu versetzen, der eine Entdifferenzierung, eine Differenzierung und/oder Um-Differenzierung oder eine Kombination der Vorgänge erlaubt. Konkret erfolgt unter dem Einfluss der besagten Proteine eine Entdifferenzierung oder Reprogrammierung einer Zelle, die sodann erlaubt, dass sich die Zelle ggf. in einen Zustand differenziert, der dem der Ausgangszelle oder dem einer anderen, d. h. von der Ausgangszelle verschiedenen Zelle entspricht. In einem jeden Fall werden die Zellen unter dem Einfluss der besagten Proteine in einen reaktivierten Zustand versetzt. Dieser den verschiedenen Anwendungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Mechanismus ist dabei in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die besagten Proteine als sog. Masterproteine eine Vielzahl von Genen kontrollieren und den funktionalen Zustand der Zelle bestimmen. Als Modulatoren von Transkriptionsfaktorkomplexen können sie grundsätzlich sowohl positiv als auch negativ auf die Expression ihrer Zielgene einwirken. Dazu binden sie mehr struktur- als sequenzspezifisch an die entsprechenden Promotoren und biegen die DNA, so dass entweder die Bindung der Transkriptionsfaktoren vermittelt wird oder die Transkriptionsfaktoren ihre Fähigkeit verlieren, in diesem Bereich mit der DNA zu assoziieren. Aufgrund dieser Eigenschaft werden die besagten Proteine auch als architektonische Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Weiterhin haben die vorliegenden Erfinder festgestellt, dass die besagten Proteine und insbesondere die HMG-Proteine in der Embryonal- und Fetalentwicklung am Zell- und Gewebeaufbau beteiligt sind, während sie in den meisten differenzierten Zellen nach der Geburt nicht mehr nachweisbar sind. Während der frühen Embryogenese kann die mRNA einiger HMG-Proteine in nahezu allen Geweben detektiert werden. In der späteren Embryogenese ist die Expression auf mesenchymale Derivate und einige epitheliale Zellgewebe beschränkt.

Wie hierin offenbart, sind die hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin beschriebenen HMG-Proteine, deren Transkriptionsprodukte, deren Translationsprodukte, davon abgeleitete funktionale Nukleinsäuren und unter deren Anwendung durch die hierin offenbarten Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen in einer Vielzahl von biologischen Prozessen, die hierin auch zusammenfassend als Prozesse bezeichnet werden, beteiligt. Diese Prozesse sind den Fachleuten auf dem Gebiet grundsätzlich als solches bekannt. Insbesondere ist den Fachleuten auch die Beteiligung einer oder mehrerer dieser Prozesse an Erkrankungen oder pathologischen Zuständen von Wirbeltieren, insbesondere von Säugetieren und dem Menschen bekannt. Es ist somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin beschriebenen HMG-Proteine, deren Transkriptionsprodukte, deren Translationsprodukte, davon abgeleitete funktionale Nukleinsäuren und unter deren Anwendung durch die hierin offenbarten Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen zur Prävention und/oder Behandlung von Erkrankungen oder pathologischen Zuständen bzw. zur Herstellung von Medikamenten zu deren Behandlung verwendet werden können, bei denen einer oder mehrerer der besagten Prozesse beteiligt ist. Die hierin offenbarten Erkrankungen, hierin auch als Krankheiten bezeichnet, stellen Beispiele hierfür dar. Die Anwendung der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin beschriebenen HMG-Proteine, deren Transkriptionsprodukte, deren Translationsprodukte, davon abgeleitete funktionale Nukleinsäuren und unter deren Anwendung durch die hierin offenbarten Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen ist jedoch nicht darauf beschränkt.

Es ist weiterhin im Rahmen der vorliegenden Erfindung und für die Fachleute ohne weiteres zu erkennen, dass die hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin beschriebenen HMG-Proteine, deren Transkriptionsprodukte, deren Translationsprodukte, davon abgeleitete funktionale Nukleinsäuren und unter deren Anwendung durch die hierin offenbarten Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen, sowohl inhibitorisch als auch aktivieren wirken können und insoweit sowohl Erkrankungen behandelt werden können, bei denen die besagten Prozesse erwünscht sind und somit durch die besagten Verbindungen gefördert oder unterstützt werden sollen, als auch solche, bei denen die besagten Prozesse unerwünscht sind und somit durch die besagten Verbindungen inhibiert werden sollen. In diesem Zusammenhang werden die hierin offenbarten DNA- bindenden Proteine, insbesondere die hierin offenbarten HMG-Protein, die für sie codierenden Nukleinsäure(n), sowie deren Transkriptions- und

Translationsprodukt(e) bevorzugt zur Förderung der besagten Prozesse verwendet. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin offenbarten HMG-Protein, die für sie codierenden Nukleinsäure(n), sowie deren Transkriptions- und Translationsprodukt(e) auch für eine Inhibierung dieser Prozesse eingesetzt werden. Wird mit der Gabe der die hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin offenbarten HMG-Protein, der für sie codierenden Nukleinsäure(n), sowie deren Transkriptions- und Translationsprodukt(e) typischerweise ein Mangel derselben kompensiert bzw. deren aktive Konzentration erhöht, kann diese zusätzliche Gabe auch zu einer Inhibierung, beispielsweise im Sinne einer kompetitiven Hemmung führen. Im Gegensatz dazu werden die funktionalen Nukleinsäuren, wie sie hierin offenbart sind, insbesondere die Antisense-Moleküle, RNAi, Aptamere, Spiegelmer und Aptazyme, die gegen die hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin offenbarten HMG-Protein, die für sie codierenden Nukleinsäure(n), sowie deren Transkriptions- und Translationsprodukt(e) gerichtet sind, bevorzugterweise zu einer Inhibierung der Prozesse, die durch diese vermittelt werden, führen. Gleiches gilt auch für die gegen die hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin offenbarten HMG-Protein, die für sie codierenden Nukleinsäure(n), sowie deren Transkriptions- und Translationsprodukt(e), gerichteten Antikörper, Peptide und Verbindungen, die im Rahmen der hierin offenbarten Screening-Verfahren identifiziert oder erhalten wurden. Generell gilt, dass die gegen die hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin offenbarten HMG-Protein, die für sie codierenden Nukleinsäure(n), sowie deren Transkriptions- und Translationsprodukt(e) gerichteten Antikörper und Peptide grundsätzlich in gleicher Art und Weise und im gleichen Umfang verwendet werden können, wie die hierin offenbarten funktionalen Nukleinsäuren.

Beispiele für Erkrankungen, bei denen die Wirkung der hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin offenbarten HMG-Protein, die für sie codierenden Nukleinsäure(n), sowie deren Transkriptions- und Translationsprodukt(e) gefördert werden sollen, sind beispielsweise Angiogenese, Herzinfarkt durch transmyokardiale Revaskularisierung, Wundheilung, Angiogenese um Wundbett, Epithelisierung und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten. Erkrankungen, bei denen die Wirkung der hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin offenbarten HMG-Protein, der für sie codierenden Nukleinsäure(n) sowie deren Transkriptions- und Translationsprodukt(e) inhibiert werden sollen, sind beispielsweise Endometriose, Psoriasis, Makuladegenration, insbesondere

altersbedingte Makuladegeneration, Cornea-Erkrankungen, bevorzugterweise solches des Menschen und des Hundes, die mit einer Angiogenese einhergehen, bevorzugterweise der Pannus, d.h. eine chronische superfizielle Keratitis, Histiozytosen, bevorzugterweise akute Formen, bevorzugterweise solche in der Veterinärmedizin.

Die Verwendung der hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere der hierin offenbarten HMG-Proteine, der für sie codierenden Nukleinsäure(n), sowie deren Transkriptions- und Translationsprodukt(e), der gegen sie gerichteten funktionalen Nukleinsäuren, Antikörper und Peptide sowie der unter deren Verwendung erhaltenen und/oder identifizierten Verbindungen ist besonders dann mit Vorteilen verbunden, wenn an einer Erkrankung mehrere der Prozesse beteiligt sind, die durch diese gefördert bzw. inhibiert werden. Beispielhaft seien hier Psoriasis, Makuladegeneration und Endometriose sowie der Pannus beim Hund genannt, bei denen sowohl inflammatorische Prozesse als auch Prozesse der Angiogenese, die durch die hierin offenbarten DNA-bindenden Proteine, insbesondere durch die hierin offenbarten HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäure(n) (mit)verursacht werden, wobei hier insbesondere HMGB-Protein eine Rolle spielt. Infolgedessen sind insbesondere funktionale Nukleinsäuren, Peptide und Antikörper dagegen bzw. gegen das Transkriptionsprodukt geeignete Mittel zur Behandlung. Gleiches gilt für Verbindungen, die die Wirkung von HMGB-Protein bzw. der dafür codierenden Nukleinsäure inhibieren, die beispielsweise durch ein erfindungsgemäßes Screening-Verfahren identifiziert werden können.

Die vorliegende Erfindung basiert weiterhin auf der überraschenden Erkenntnis, dass insbesondere Angehörige der HMGA- und der HMGB-Familie Angiogenese- oder Neovaskularisierungsprozesse auslösen können. Dabei wird Angiogenese in einem Ausmaß angeregt, dass mit dem durch hochspezialisierte Angiogenesefaktoren wie VEGF bewirkten vergleichbar ist. Im Gegensatz zur Verwendung hochspezialisierter angiogenetischer Faktoren wie VEGF sind durch die Verwendung von HMG-Proteinen noch weitere Effekte zu erzielen, wie nachfolgend dargelegt wird.

Weiterhin liegt der vorliegenden Erfindung die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass aus der Gruppe der HMG-Proteine insbesondere HMGB1 sowie HMGA1 eine starke angiogene Wirkung zeigen und insoweit zur Behandlung von Erkrankungen, die mit Angiogenese im Zusammenhang stehen, wie hierin ausgeführt, verwendet werden können. Dieser Verwendung

liegt die überraschende Beobachtung zugrunde, dass die angiogenen Effekte, abgeleitet aus der Sprossenlänge von Blutgefäßen, überraschend groß sind. Diese Effekte sind im Gegensatz dazu bei einer HMGB1-induzierten Freisetzung von Cytokinen nicht zu erwarten.

Darüberhinaus haben die vorliegenden Erfinder überraschend festgestellt, dass nekrotische Zellen, insbesondere nekrotische Tumorzellen HMGB1 ausschütten, und im bestimmten Umfang auch HMGA-Proteine, und als extrazelluläre Liganden über den Rezeptor RAGE Endothelzellen zur Vaskular-/Angiogenese anregen. Aus diesem Mechanismus ergibt sich im übrigen, dass gegen HMG, insbesondere HMGB1 und HMGA, hier wiederum HMGA1, gescreente Wirkstoffe besonders für jene Tumorerkrankungen verwendet werden können, die nekrotische Zellen umfassen bzw. nekrotische Tumorzellen umfassen bzw. die hierin beschriebenen Screening-Verfahren derartige Moleküle liefern werden bzw. zu liefern in der Lage sind. Weiterhing ergibt sich aus diesem Mechanismus, dass gegen die vorstehend genannten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren gerichtete funktionale Nukleinsäuren, Antikörper oder Peptide als Mittel zur Behandlung von Tumoren, insbesondere von solchen Tumoren verwendet werden können, die HMGB1 ausschütten und/oder im bestimmten Umfang auch HMGA-Proteine und/oder als extrazelluläre Liganden über den RAGE Endothelzellen zur Vaskular-/Angiogenese anregen.

Die Bildung neuer Blutgefäße ist bei einer Vielzahl von Vorgängen, beispielsweise bei der Wundheilung, dem Tumorwachstum und der Neovaskularisierung zur Behandlung von Hypoxien und Ischämie in myokardialen Gewebe von Bedeutung. Dabei werden zwei unterschiedliche Mechanismen unterschieden, die an diesen Vorgängen grundsätzlich beteiligt zu sein scheinen: einerseits die Vaskulogenese, d. h. die Gefäßneubildung aus sich in situ differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen und andererseits die Angiogenese, d. h. die Neubildung von Gefäßen aus bestehenden Blutgefäßen. Die Endothelzellen ausgereifter Blutgefäße des erwachsenen Organismus befinden sich in einem ruhenden, nicht proliferativen Stadium. Erst durch einen bestimmten Stimulus, wie z. B. Entzündung, Trauma, Hypoxie oder Ischämie werden sie in die Lage versetzt, am Prozess der Angiogenese mitzuwirken bzw. den Prozess der Angiogenese zu stimulieren. Anschließend kommt es zu einer Kaskade verschiedener aufeinanderfolgender Prozesse, die unter anderen die Wanderung, Proliferation und erneute Verbindung von Endothelzellen beinhaltet. Als Ergebnis davon kommt es zur Bildung eines neuen, dreidimensionalen „Gefäßschlauches“. Bei der Angiogenese bzw.

Neogenese von Gefäßen, die größer als Kapillaren sind, wandern zusätzlich Myozyten der glatten Gefäßwandmuskulatur ein, wodurch die Stabilität des neugebildeten Gefäßes gewährleistet wird.

Von der großen Anzahl der bei der Angiogenese beteiligten Wachstumsfaktoren und Cytokinen sind insbesondere die Wachstumsfaktoren Fibroblast Growth Factor (FGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) als die entscheidenden zu bewerten. Sie sind als potente mitogen wirksame Faktoren der Endothelzellen bekannt. Durch die Applikation von Wachstumsfaktoren bzw. Molekülen, welche wiederum stimulatorisch auf bestimmte Wachstumsfaktoren wirken, wird eine verbesserte Durchblutung des zu behandelnden Areals gewährleistet.

Eine klinisch wichtige Form der Angiogenese findet im Rahmen der sogenannten transmyokardialen Laser-Revaskularisation (TMLR) statt. Dabei werden durch Laserimpulse kleine Kanäle im Herzmuskel erzeugt. Vermutlich durch die traumatische Stimulierung des Herzmuskelgewebes in der Nähe der so erzeugten Kanäle kommt es in deren Umgebung zu Angiogenese, was letztlich zu einer verbesserten Durchblutung des Herzmuskels insbesondere im Bereich des ischämischen Gewebes führt. Transmyokardiale Revaskularisierung umfasst insbesondere Revaskularisierung nach Herzinfarkt, aber auch Revaskularisierung bei früheren Stadien von Herzkrankheiten wie Ischämie oder gefäßbedingter Herzinsuffizienz. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sollen die Begriffe Angiogenese, Vaskulogenese, Vaskularisierung, Neovaskularisierung und Revaskularisierung synonym verwendet werden, wobei in jedem Fall auf den auftretenden Effekt abgestellt wird, dass – unabhängig vom zugrundeliegenden molekularen oder zellulären Mechanismus – Blutgefäßbildung stattfindet.

Eine gezielte Beeinflussung von Angiogenese oder Neovaskularisierung im Sinne einer Förderung oder auch Inhibierung dieser Prozesse eröffnet die Möglichkeit, mit Angiogenese oder Neovaskularisierung im Zusammenhang stehende Krankheiten zu behandeln.

Dies betrifft beispielsweise Krankheiten, bei denen aufgrund unzureichender Blutversorgung ischämische Zustände vorliegen, beispielsweise bei Herzkranzgefäßverengung oder

Arteriosklerose. In solchen Fällen könnte die Induktion neuer Blutgefäße durch Angiogenese oder Neovaskularisierung alternative Gefäße zur Versorgung mit Blut bereitstellen und somit zu einer Linderung der Krankheit beitragen. Weitere Beispiele für Krankheiten, die durch unzureichende Blutversorgung bedingt sind, sind Geschwüre, schlecht heilende oder chronische Wunden, Schwangerschaftsstörungen wie Gestose bis hin zur Unfruchtbarkeit.

In anderen Fällen können Krankheiten auf der übermäßigen Bildung von Blutgefäßen beruhen. Ein Beispiel hierfür ist die proliferative Retinopathia diabetica, bei der Gefäßneubildungen auf und vor der Netzhaut bis zur Erblindung führen können. Ein anderes Beispiel ist die Bildung von Tumoren. Es ist inzwischen hinlänglich bekannt, dass erfolgreiches Tumorwachstum eine ausreichende Versorgung der Krebszellen mit Nährstoffen erfordert, was wiederum eine ausreichende Versorgung des Tumorortes mit Blutgefäßen voraussetzt. Tumore, die nicht in der Lage sind, eine ausreichende Versorgung mit Blutgefäßen zu induzieren, sind deswegen in ihrem Wachstum begrenzt. Umgekehrt kann das Wachstum von Tumoren aktiv dadurch begrenzt werden, dass die Versorgung mit Blutgefäßen unterbunden wird. Gerade im Bereich der Haut wurden viele Arten von krebsartigen Erkrankungen mit übermäßiger Angiogenese in Verbindung gebracht, beispielsweise Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanome, Kaposi-Sarkom sowie aktinische Keratome als Krebsvorstufe. Prinzipiell kann aber jede Art von Krebs oder Tumor als mit übermäßiger Angiogenese einhergehend betrachtet werden. Weitere Beispiele für durch übermäßige Angiogenese bedingte Krankheiten sind Psoriasis sowie Arthritis.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sollen unter Krankheiten nicht nur Krankheiten oder Erkrankungen im klassischen Sinne wie beispielsweise Retinopathie, Psoriasis oder Tumore verstanden werden, sondern allgemein alle Zustände, deren Aufhebung im Sinne des Wohlbefindens eines Patienten wünschenswert ist. Dazu zählen insbesondere auch künstlich herbeigeführte Verletzungszustände, wie sie beispielsweise im Rahmen chirurgischer Eingriffe auftreten, beispielsweise OP-Wunden oder Wunden, die durch Einsetzung von Prothesen oder Implantaten entstehen.

Angiogenese tritt auch in einer kontrollierten, durch eine Reihe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren koordinierten Weise im Zusammenhang mit Wundheilung auf, einem dynamischen Prozess mit komplexer Wechselwirkung zwischen Zellen, extrazellulärer Matrix, Plasmaproteinen. Dabei kommt der Angiogenese die Aufgabe zu, Versorgungswege bereitzustellen, über die Zellen, Nährstoffe und andere Substanzen in das Wundgebiet transportiert werden können, wobei diese Versorgungswege nach abgeschlossenem Heilungsprozeß und gegebenenfalls zahlenmäßiger Reduktion zur Aufrechterhaltung der Versorgung des geheilten Gewebes bestehen bleiben können. Unabhängig von der Art der Wunde und dem Ausmaß des Gewebeverlustes lässt sich die Wundheilung grob in die sich zeitlich überlappenden Phasen der inflammatorischen bzw. exsudativen Phase, der proliferativen Phase sowie der Differenzierungs- und Umbauphase einteilen. Die Phaseneinteilung orientiert sich aber an den grundsätzlichen morphologischen Veränderungen im Laufe der Reparationsprozesse, ohne die eigentlich Komplexität der Vorgänge widerzuspiegeln.

Der Prozess der Wundheilung lässt sich quantitativ in eine primäre und sekundäre Wundheilung einteilen, wobei um der therapeutischen Problematik, die sich aus dem Umfang und der Art der Gewebeerstörung ergibt, Rechnung zu tragen, weiter in die verzögerte Primärheilung sowie den chronischen Wundverlauf unterschieden wird. Eine primäre Wundheilung ist zum Beispiel bei glatten, dicht aneinanderliegenden Wundflächen einer Schnittwunde ohne nennenswerten Substanzverlust und ohne Einlagerung von Fremdkörpern in einem gut mit Blutgefäßen versorgten Gewebe der Fall. Eine primäre Wundheilung ist üblicherweise bei chirurgisch gesetzten Wunden oder bei Gelegenheitswunden durch scharfkantige Gegenstände gegeben. Ist aufgrund der Wundentstehung mit einer Infektion zu rechnen, tritt die verzögerte Primärheilung ein. Manifestiert sich eine Infektion, so wird die Wunde als sekundärheilend eingestuft. Eine Sekundärheilung ist bei größeren Defekten, bei denen ein Granulationsgewebe aufgebaut werden muss oder wenn eine Infektion die direkte Vereinigung der Wundränder nicht zulässt, gegeben. Ist die Heilung einer Wunde nicht innerhalb von acht Wochen abgeschlossen, so spricht man von einem chronischen Heilungsverlauf. Eine chronische Wunde kann in jeder Wundheilungsphase entstehen und entwickelt sich meistens aus fortschreitender Gewebeerstörung infolge von Geweberkrankungen unterschiedlicher Genese, lokalen Druckschäden, Strahlenschäden oder Tumoren.

Eine weitere Unterscheidung der Wundheilung kann basieren auf der Unterscheidung in akute Wunden und chronische Wunden. Zu den akuten Wunden zählen die akuten traumatisch bedingten Wunden bis hin zu komplexen traumatischen Defekten, die thermischen und chemischen Verletzungen/Verbrennungen und Inzisionen/OP-Wunden.

Bei akuten traumatisch bedingten Wunden erfolgt für den Fall, dass sich die Wundränder spannungsfrei adaptieren lassen, gegebenenfalls nach erfolgter Wundexzision, ein primärer Wundverschluss durch Naht, Klammern oder Wundnahtstreifen. Bei Wunden, die eine potentielle Infektionsgefährdung aufweisen, wird die Wunde dagegen zunächst mit sterilen feuchten Verbänden offen gehalten, bis eine Infektion ausgeschlossen werden kann. Bei sekundär heilenden und komplexeren Wunden ist der Wundverschluss wesentlich vielschichtiger.

Bei thermischen und chemischen Wunden, d. h. solchen, die durch Einwirkung von Hitze und Kälte oder gewebeschädigenden Strahlen, Säuren oder Laugen entstehen, erfolgt die Behandlung entsprechend dem Schädigungsmuster. Bei schwer verbrannten Patienten erfolgt zum Beispiel zunächst eine Nekrektomie mit einem anschließenden chirurgischen Ersatz durch ein Hauttransplantat. Dabei werden für den Fall, dass die Wunde nicht transplantierbar ist oder durch die ausgedehnten Verbrennungen nicht mehr genügend Spenderstellen zur Verfügung stehen, sogenannte Allo- und Xenotransplantate verwendet. Bei ausreichend vorhandenen Spenderarealen kann auf permanente autologe Hauttransplantation zurückgegriffen werden. Eine Sonderform ist dabei die autologe Keratinocyten-Transplantation.

Chronische Wunden sind sekundär heilende Wunden, die trotz kausaler und sachgerechter lokaler Therapie innerhalb von acht Wochen nicht abheilen. Obgleich sich chronische Wunden jederzeit aus einer akuten Wunde entwickeln können, stellen die überwiegenden Fälle von chronischen Wunden das letzte Stadium einer fortschreitenden Gewebeerstörung dar, die ausgelöst wird durch venöse, arterielle oder stoffwechselbedingte Gefäßleiden, Druckschädigungen, Strahlenschäden oder Tumoren. Die verschiedenen Typen chronischer Wunden werden durch unterschiedliche Pathologien hervorgerufen, wobei die Wunden biochemisch betrachtet als ähnlich gelten. Zu den lokalen Faktoren, die die Wundheilung beeinträchtigen, zählen unter anderem Fremdkörper, Ischämie, wiederholte Traumata und Infektionen. Des Weiteren können systemische Faktoren wie beispielsweise erhöhtes Alter,

Unter- und Fehlernährung, Diabetes sowie Nierenerkrankungen einen Einfluss auf die Wundheilung haben. Zu den volkswirtschaftlich relevantesten chronischen Wundheilungsstörungen zählen, unter anderem, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, das diabetische Ulcus, das Dekubitalulcus und die chronische posttraumatische Wunde.

Eine wesentliche Ursache chronischer Wunden ist ein Ungleichgewicht zwischen Reparaturprozessen, die zur Bildung von neuem Gewebe führen und destruktiven Prozessen, die zur Entfernung des geschädigten Gewebes führen. Beispielsweise kann eine erhöhte Proteaseaktivität, zum Beispiel durch Überexpression von Matrixmetalloproteasen zu einer fehlgesteuerten Degradierung der extrazellulären Matrix führen. Durch die u. a. proliferationsfördernde Wirkung der basischen DNA-bindenden Proteine und insbesondere der HMG-Proteine kann das Ungleichgewicht zwischen der Synthese und Degradierung der extrazellulären Matrix und daraus resultierende Verschiebung des Wundgleichgewichts in Richtung destruktiver Prozesse aufgehoben werden. Gegenüber dem Einsatz einzelner exogener Wachstumsfaktoren, die meistens eine spezifische Signalkaskade induzieren, besitzen die besagten Proteine den entscheidenden Vorteil, dass sie als architektonische Transkriptionsfaktoren eine ganze Reihe unterschiedlicher proliferationsfördernder Signaltransduktionswege ansprechen und somit ein breiteres Wirkungsspektrum aufweisen. Die besagten Proteine können durch die Synthese einer Reihe von funktionellen Proteinen in unterschiedlichen Zellen, wie zum Beispiel Keratinocyten, Fibroblasten und Endothelzellen, induzieren. Die besagten Proteine greifen darüber hinaus an einem späteren Punkt in die Signalkaskaden ein als die initial wirkenden exogenen Wachstumsfaktoren, die häufig vermutlich durch den hohen Proteasegehalt chronischer Wundflüssigkeit im Übrigen sehr schnell abgebaut werden.

Die Behandlung der verschiedenen Wunden kann grundsätzlich in eine passive und eine aktive Wundtherapie eingeteilt werden. Als Sonderform können auch sog. Hautersatzverfahren verwendet werden. Bei der passiven Wundtherapie werden zum einen inaktive, textile Verbandstoffe verwendet, die als reines Abdeckungsmaterial dem Infektionsschutz dienen. Interaktive Wundaufgaben dienen im Unterschied zu den inaktiven Verbandstoffen häufig dazu, ein feuchtes Wundmilieu zu schaffen und damit den Heilungsprozess zu beschleunigen. Dabei werden, unter anderem, Hydrokolloide, Hydrogele, Hydropolymere und Schaumverbände sowie Kalziumalginate verwendet. Der Nachteil dieser passiven Wundtherapie liegt darin, dass das

Verbandsmaterial die aktive Heilung von Problemwunden nicht befördert, insbesondere bei chronischen Wunden, die häufig als therapieresistent gelten.

Die im Stand der Technik angeführten, zur Wundheilung verwendeten hochmolekularen Verbindungen, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Cytokine, Gerinnungsfaktoren und dergleichen, greifen selektiv in das Geschehen der Wundheilung bzw. Hautalterung ein. Bei einer Verwendung der basischen DNA-bindenden Proteine wie der HMG-Proteine kann jedoch infolge des zentralen Wirkmechanismus der besagten Proteine sehr zu Beginn des Differenzierungszustandes eine ganzheitliche Regeneration des Gewebes bzw. der einzelnen Zellen realisiert werden. Die überraschend beobachtete Wirkung der besagten Proteine zu Zwecken der Wundheilung im weitesten Sinne, wie sie hierin definiert ist, beruht dabei auf den folgenden Abläufen bzw. Mechanismen, wobei darauf abgestellt werden kann, dass die besagten Proteine sowohl in der proliferativen wie der Differenzierungs- und Umbauphase des Wundheilungsprozesses, einschließlich Aufbauen des Granulationsgewebes, Stimulation der Angiogenese sowie Proliferation und Migration von Epithelzellen, eingreifen und für diese Prozesse oder in Verfahren, die auf diesen Prozessen beruhen, verwendet werden können. Entsprechend ergibt sich eine Verwendung der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren bei Krankheiten, die mit diesen Prozessen bzw. Phasen verbunden sind, einhergehen, darauf zurückgreifen und/oder auf diese kausal oder symptomatisch zurückgehen.

Für den Heilungsprozess ist weiterhin eine ausreichende Durchblutung des Wundbereichs von essentieller Bedeutung. Ist dieser stark eingeschränkt, kann ein ausreichender Wundstoffwechsel nicht gewährleistet werden und dies zu einem chronischen Heilungsverlauf führen. Die basischen DNA-bindenden Proteine und insbesondere die HMG-Proteine fördern durch die Induktion der Proliferation von Endothelzellen auch die Angiogenese im Wundbett. Schließlich spielt bei Wundheilungsstörungen die Seneszenz von Zellen eine besondere Rolle. Ein zunehmendes Alter von dermalen Fibroblasten korreliert mit einem reduzierten Potential zur Proliferation. Fibroblasten in chronischen Wunden weisen eine verschlechterte Reaktion auf Wachstumsfaktoren auf, die vermutlich auf eine steigende Anzahl an seneszenten Zellen zurückzuführen ist. Die besagten Proteine besitzen die Fähigkeit, diese Zellen durch ihre reprogrammierende oder „verjüngende“ Eigenschaften wieder in einen aktiven Zustand zu versetzen und ihre Proliferation zu reaktivieren.

Schließlich stellt eine stark eingeschränkte Epithelisierung eine weitere Störung im Heilungsprozess von chronischen Wunden dar, wodurch die Heilung nicht zum Abschluss gebracht werden kann. Ein Faktor ist dabei die eingeschränkte Migration von Epithelzellen am unmittelbaren Ulcusrand. Die vorliegenden Erfinder haben gezeigt, dass HMG-Proteine die Mobilität von Zellen erhöhen können, so dass auch im Hinblick auf die Migration von Epithelzellen eine positive Wirkung durch die HMG-Proteine auftritt.

Wie hierin verwendet kommt den basischen DNA-bindenden Proteinen die hierin beschriebenen Funktionen zu.

Namensgebend für HMG-Proteine ist ihre hohe elektrophoretische Mobilität in Polyacrylamidgelen. Sie gehören zu den chromosomalen Nicht-Histon-Proteinen und sind primär nicht über ihre Proteinfunktion, sondern unter den Gesichtspunkten chemischer und physikalischer Eigenschaften definiert. Alle Mitglieder dieser Proteine sind aus Chromatin durch 0,35 M NaCl extrahierbar, sind in 2 bis 5 %iger Perchlorsäure löslich, weisen einen hohen Gehalt von geladenen Aminosäuren und ein Molekulargewicht von unter 30.000 Da auf. Die HMG-Proteine werden unter Berücksichtigung von Sequenzhomologien und Sequenzmotiven in drei Subgruppen unterteilt, nämlich die HMGB (früher HMG-1/2)-Familie, die HMGN (früher HMG-14/17)-Familie und die HMGA (früher HMG-I/-Y/-C)-Familie.

Die Mitglieder der HMGN-Familie werden in allen höheren Eukaryonten exprimiert. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 10.000 und 20.000 Da. Sie sind die einzigen Nicht-Histon Proteine, die mit einer höheren Affinität mit ihrer positiv geladenen Nukleosomen-Bindungs-Domäne (NBD), an den Nukleosomen-Kern als an Histon-freie DNA binden. Diese Bindungsdomäne umfaßt die Aminosäuren 12-41 des HMGN1 Proteins und die Aminosäuren 17-47 des HMGN2 Proteins und wurde auch in der Sequenz anderer Proteine gefunden; so enthält z. B. NBP45 ein NBD-Motiv in seiner primären Sequenz.

Die HMGA-Familie besteht aus drei Mitgliedern, nämlich HMGA1a und HMGA1b, die beide Splicevarianten eines Gens darstellen und dem verwandten, von einem anderen Gen codierten Protein HMGA2. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Proteine der HMGA-Familie liegt zwischen 10.000 und 12.000 Da. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie findet man zumeist nur in undifferenzierten embryonalen Zellen, in neoplastischen Zellen sowie in der exponentiellen

Wachstumsphase differenzierter Zellen. Im Unterschied dazu sind sie in differenzierten Zellen des Normalgewebes nicht oder nur in geringen Konzentrationen nachweisbar.

Proteine dieser Familie besitzen jeweils 3 separate DNA-Bindungsdomänen, sowie eine saure Proteinbindungsdomäne. Die HMGA-Proteine binden an die kleine Furche AT-reicher DNA. Bei Genen, deren Promotor/Enhancer-Sequenzen in der Nähe solcher HMGA-Bindungsstellen lokalisiert sind, kann die Bindung von HMGA zu einer Beeinflussung der Transkription führen. So spielt die Acetylierung von HMGA1 eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Enhanceosomkomplexes zur Transkription des Interferon-Beta (IFN-beta)-Gens. Weitere posttranslationale Modifikationen der HMGA-Proteine sind die Phosphorylierung, welche abhängig vom Zellzyklus ist bzw. die ADP-Ribosylierung.

Die Mitglieder der HMGB-Familie gehören zu den häufigsten HMG-Proteinen. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt maximal 25.000 Da.

HMGB-Proteine bestehen aus drei Domänen, wobei die zwei konservativen, stark sequenzzhomologen Domänen die unspezifische DNA-bindende Region der Proteine darstellen. Dieses funktionelle Motiv bezeichnet man als HMG-Box. HMGB-Proteine enthalten zwei dieser HMG-Boxen, nämlich Box A und B. Der C-terminale Bereich des HMGB1-Proteins bildet die Protein-bindende Domäne der HMGB-Proteine. Neben den HMGB-Proteinen gibt es eine große Anzahl anderer Proteine, bei denen sich HMG-Boxen nachweisen lassen. Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören SRY, SOX-Proteine LEF1 und UBF1 (A. D. Baxevanis und D. Landsman: The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. NAR 23, 2002, 1604-1613). Die HMGB-Proteine stellen strukturelle Komponenten des Chromatins dar und sind an der transkriptionellen Regulation beteiligt.

Grundsätzlich sind alle HMG-Proteine, sowohl die derzeit bekannten als auch zukünftig noch aufzufindenden HMG-Proteine, im Rahmen der vorliegenden Erfindung anwendbar, insbesondere nach Durchführung der hierin beschriebenen Experimente, um im Einzelfall zu bestimmen, ob das konkrete HMG-Protein die entsprechenden erfindungsgemäßen Eigenschaften und damit das Verhalten in der jeweiligen Anwendung zeigt.

Derzeit sind ca. 15 HMG-Proteine bekannt. Besonders bevorzugt für die hierin beschriebenen Verwendungen und Anwendungen sind dabei die Proteine der HMGB-Familie, der HMGA-Familie und/oder die Proteine der HMGB-Familie, letztere insbesondere in Kombination mit Proteinen der HMGA-Familie. Dabei soll es im Rahmen der vorliegenden Erfindung sein, dass die Proteine der genannten Familien nicht nur auf der Ebene der Translationsprodukte, sondern auch auf der Ebene der Transkriptionsprodukte oder der Gene bzw. codierenden Sequenzen verwendet werden können.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass aberante Transkripte der HMG-Proteine verwendet werden. Derartige trunkierte HMG-Proteine sind in der Literatur beschrieben, unter anderem auch in der internationalen Patentanmeldung WO 96/25493 oder WO 97/23611, deren Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

Bevorzugterweise weisen trunkierte HMG-Proteine, wie sie im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, die mindestens Exon 1, bevorzugterweise mindestens Exons 1 bis 3 des HMGA2-Gens sowie weitergehende Aminosäuren, die kodiert werden von Sequenzen, die aus den Regionen unterschiedlicher chromosomaler Translokationspartner des Chromosomes 12 stammen, auf. Sowohl diese trunkierten Formen als auch weitere Abwandlungen der HMG-Proteine, wie z. B. HMGA2-LPP; HMGA2-RAD51L1 (beschrieben beispielsweise in Tkachenko, A et al., Cancer Res 997; 57 (11): 2276 - 80; Schoenmakers EF et al.; Cancer Res 1999 59(1): 19-23) HMGA1-LAMA4 (beschrieben beispielsweise in Schoenmakers EF et al. aaO; Tkachenko, A et al., aaO) und SP100-HMGB1, insbesondere HMGA1a, HMGA1b sowie HMGA2 können in Form von Derivaten vorliegen. Derartige Derivate können beispielsweise durch posttranslationale Modifikation, wie beispielsweise Acetylierung oder Phosphorylierung herstellbar sein, oder aber auch durch Konjugation an andere Moleküle modifiziert sein, wobei es im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist, dass bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Proteine diese unabhängig voneinander mit gleichen oder verschiedenen Modifikationen versehen sein können oder nicht alle gleichzeitig modifiziert sind. Derartige andere Moleküle können beispielsweise aus der Gruppe ausgewählt sein, die Zucker, Lipide, Peptide und kleine organische Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000 umfasst.

Bevorzugte HMG-Proteine, die im Rahmen der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind ein jedes einzelne der folgenden, in Tabelle 1 angegebenen Proteine, die mit den SEQ ID NOs. 1 bis 30 bezeichnet werden. Tabelle 1 gibt dabei einen Überblick unter Angabe der SEQ ID NOs., der Aminosäurelänge, der Zugangsnummer des Datenbankeintrages, sofern vorhanden, sowie des Aufbaus der Exonstruktur und daran angefügter, gegebenenfalls vorhandener zusätzlicher Aminosäuren.

Tabelle 1: Bevorzugte HMG-Proteine

SEQ ID NO.	Name des Proteins	Proteinlänge	Exon-Struktur	Zugansnr.
1	HMGA1a-Protein	107 Aminosäuren		X14957
2	HMGA1b-Protein	96 Aminosäuren		X14958
3	HMGA2-Protein	109 Aminosäuren		P52926
4	trunkiertes HMGA2	83 Aminosäuren	Exon 1-3	
5	trunkiertes HMGA2: IC113 ORF	90 Aminosäuren	Exon 1-3 + 7 Aminosäuren	U29113
6	trunkiertes HMGA2: IC117 ORF	96 Aminosäuren	Exon 1-3 + 13 Aminosäuren	U29117
7	HMGB1-Protein	215 Aminosäuren		S02826
8	trunkiertes HMGA2	147 Aminosäuren	Exon 1-3 + 64 Aminosäuren	U29119
9	trunkiertes HMGA2	106 Aminosäuren	Exon 1-3 + 23 Aminosäuren	U29112
10	trunkiertes HMGA2	92 Aminosäuren	Exon 1-3 + 9 Aminosäuren	H98218
11	trunkiertes HMGA2	96 Aminosäuren	Exon 1-4 + 2 Aminosäuren	U29120
12	trunkiertes HMGA2	118 Aminosäuren	Exon 1-4 + 24 Aminosäuren	U29115
13	trunkiertes HMGA2	95 Aminosäuren	Exon 1-4 + 1 Aminosäure	U29114
14	HMGA1a AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 5, Position im Protein AS 21-31	X14957
15	HMGA1a AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 6, Position im Protein AS 53-63	X14957
16	HMGA1a AT-Hook 3	12 Aminosäuren	Codiert von Exon 7, Position im Protein AS 78-89	X14957

17	HMGA1b AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 5, Position im Protein AS 21-31	X14958
18	HMGA1b AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 6, Position im Protein AS 42-52	X14958
19	HMGA1b AT-Hook 3	12 Aminosäuren	Codiert von Exon 7, Position im Protein AS 67-78	X14958
20	HMGA2 AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 1, Position im Protein AS 24-34	P52926
21	HMGA2 AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 2, Position im Protein AS 44-54	P52926
22	HMGA2 AT-Hook 3	21 Aminosäuren	Codiert von Exon 3, Position im Protein AS 71-91	P52926
23	HMGB1 HMG-BOX A (LARGE)	78 Aminosäuren	Codiert von Exon 2 + 3, Position im Protein AS 6-83	S02826
24	HMGB1 HMG-BOX A (SMALL)	71 AS (P09429)	Codiert von Exon 2 + 3, Position im Protein AS 9-79	P09429
25	HMGB1 HMG-BOX A (MEDIUM)	73 Aminosäuren	Codiert von Exon 2 +3, Position im Protein AS 6-78	NP_002119
26	HMGB1 HMG-BOX B (LARGE)	75 Aminosäuren	Codiert von Exon 3 - 5, Position im Protein AS 92-166	S02826
27	HMGB1 HMG-BOX B (MEDIUM)	69 Aminosäuren	Exon 3 - 5, Position im Protein AS 95-163	P09429
28	HMGB1 HMG-BOX B (SMALL)	49 Aminosäuren	Codiert von Exon 3 + 4, Position im Protein AS 95-143	NP_002119
29	SP100-HMGB1	181 Aminosäuren	Alternatives Exon (HMGB1L3)	AF076675
30	HMGA2-LPP	225 Aminosäuren	Exon 1-3 + 142 Aminosäuren	

Die im Rahmen der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung verwendeten Nukleinsäuren sind dabei solche Nukleinsäuren bzw. deren Transkriptionsprodukte, die für die HMG-Proteine, wie sie hierin beschrieben sind, codieren und deren Derivate. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine jegliche Nukleinsäure umfasst ist, die für die vorstehend genannten HMG-Proteine codiert. Entsprechende Nukleinsäuren können durch die Degeneriertheit des genetischen Codes umfasst werden. Besonders bevorzugte Nukleinsäuren sind dabei jene, wie sie hierin mit den SEQ ID NOs. bezeichnet werden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über verschiedene, besonders bevorzugte, für die DNA-bindenden Proteine codierenden Nukleinsäuren. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die besagten Nukleinsäuren solche sind, die mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren bzw. ihren Transkriptionsprodukten und/oder deren Komplementärsträngen hybridisieren, insbesondere unter stringenten Hybridisierungsbedingungen. Derartige stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise solche, die in 0,1×SSC/0,1 % SDS bei 68°C (Perfect HybTM Plus (Hybridisierungspuffer der Firma Sigma)) oder in 5×SSC/50 % Formamid/0,02 % SDS/2 % Blocking Reagenz/0,1 % N-Lauroylsarcosin bei 42°C über Nacht durchgeführt werden.

Weiterhin umfasst sind solche Nukleinsäuren, die eine Identität von mindestens 65, bevorzugterweise 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 oder 99 % zu den besagten Nukleinsäuren aufweisen. Unter Transkriptionsprodukt wird hierin insbesondere auch die hnRNA oder mRNA bzw. cDNA der für HMG-Proteine codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, verstanden.

Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass von der Nukleinsäuresequenz von Genen von HMG-Proteinen abgeleitete inhibitorische Sequenzen wie Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen oder RNAi verwendet werden. Antisense-Nukleinsäuren, die in der Regel als Antisense-Oligonukleotide eingesetzt werden, weisen Basenkomplementarität mit einer Ziel-RNA, bevorzugterweise der mRNA eines zu exprimierenden Gens auf, und hybridisieren deswegen mit dieser Ziel-RNA, wodurch das Enzym RNase H aktiviert wird und zu einem Abbau der Nukleinsäuren führt. Ribozyme sind katalytisch aktive Nukleinsäuren, die bevorzugterweise aus RNA bestehen und zwei Teilbereiche aufweisen. Dabei ist der erste Teilbereich für eine katalytische Aktivität verantwortlich, während der zweite Teil für eine

spezifische Wechselwirkung mit einer Ziel-Nukleinsäure verantwortlich ist. Wenn es zur Ausbildung einer Wechselwirkung zwischen der Ziel-Nukleinsäure und dem zweiten Teil der Ribozyms kommt, die typischerweise auf einer Hybridisierung von zueinander im wesentlichen komplementären Basenbereichen beruht, dann kann der katalytische Teil des Ribozyms entweder intramolekular oder intermolekular die Ziel-Nukleinsäure hydrolysieren, falls die katalytische Wirkung des Ribozyms eine Phosphodiesterase-Aktivität ist. Als Folge davon kommt es zu einem Abbau der codierenden Nukleinsäure und letztlich zu einer Verringerung der Expression des Zielmoleküls sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Translationsebene. RNAi ist eine doppelsträngige RNA, die RNA-Interferenz vermittelt und typischerweise eine Länge von etwa 21 bis 23 Nukleotiden aufweist. Einer der beiden Stränge der RNA entspricht dabei der Sequenz eines abzubauenen Gens. Bei Einführung einer RNAi in einem Strang komplementär ist zu bevorzugterweise der mRNA eines Gens, kann die Expression dieses Gens somit verringert werden. Die Erzeugung und Verwendung von RNAi als Medikament bzw. diagnostisches Mittel ist beispielsweise beschrieben in den internationalen Patentanmeldungen WO 00/44895 und WO 01/75164.

Tabelle 2 Bevorzugte, für die DNA-bindenden Proteine codierenden Nukleinsäuren

SEQ ID NO.	Name der Nukleinsäure	Anzahl der Basenpaare	Exon-Struktur	Zugansnr.
31	HMGA1a mRNA			M23614
32	HMGA1a Coding Sequence	324		M23614
33	HMGA1b mRNA			M23616
34	HMGA1b Coding Sequence	291		M23616
35	HMGA2 mRNA			NM_003483
36	HMGA2 Coding Sequence	330		NM_003483
37	trunkiertes HMGA2	252	Exons 1-3 + 3 bp STOP-Codon	
38	trunkiertes HMGA2: IC113 ORF	273	Exons 1-3 + 21 Basenpaare + 3 bp STOP-Codon	U29113

39	trunkiertes HMGA2: IC117 ORF	291	Exons 1-3 + 39 Basenpaare + 3 bp STOP-Codon	U29117
40	HMGB1 mRNA			NM_002128
41	HMGB1 Coding Sequence	648		NM_002128
42	trunkiertes HMGA2	444	Exon 1-3 + 192 bp + 3 bp STOP-Codon	U29119
43	trunkiertes HMGA2	321	Exon 1-3 + 69 bp + 3 bp STOP-Codon	U29112
44	trunkiertes HMGA2	279	Exon 1-3 + 27 bp + 3 bp STOP-Codon	H98218
45	trunkiertes HMGA2	291	Exon 1-4 + 6 bp + 3 bp STOP-Codon	U29120
46	trunkiertes HMGA2	357	Exon 1-4 + 72 bp + 3 bp STOP-Codon	U29115
47	trunkiertes HMGA2	288	Exon 1-4 + 3 bp + 3 bp STOP-Codon	U29114
48	HMGA1a AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 5, Position 61-93 in CDS	M23614
49	HMGA1a AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 6, Position 157-189 in CDS	M23614
50	HMGA1a AT-Hook 3	36	Codiert von Exon 7, Position 232-267 in CDS	M23614
51	HMGA1b AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 5, Position 61-93 in CDS	M23616
52	HMGA1b AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 6, Position 124-156 in CDS	M23616
53	HMGA1b AT-Hook 3	36	Codiert von Exon 7, Position 199-234 in CDS	M23616

54	HMGA2 AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 1, Position 70-102 in CDS	NM_003483
55	HMGA2 AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 2, Position 130-162 in CDS	NM_003483
56	HMGA2 AT-Hook 3	63	Codiert von Exon 3, Position 211-273 in CDS	NM_003483
57	HMGB1 HMG-BOX A (LARGE)	234	Codiert von Exon 2 + 3, Position 16-249 in CDS	U51677
58	HMGB1 HMG-BOX A (SMALL)	213	Codiert von Exon 2 + 3, Position 25-237 in CDS	P09429
59	HMGB1 HMG-BOX A (MEDIUM)	219	Codiert von Exon 2 + 3, Position 16-234 in CDS	NM_002128
60	HMGB1 HMG-BOX B (LARGE)	225	Codiert von Exon 3 - 5, Position 274-498 in CDS	U51677
61	HMGB1 HMG-BOX B (MEDIUM)	207	Codiert von Exon 3 - 5, Position 283-489 in CDS	P09429
62	HMGB1 HMG-BOX B (SMALL)	147	Codiert von Exon 3 + 4, Position 283-429 in CDS	NM_002128
63	SP100-HMGB1 mRNA	546		AF076675
64	HMGA2-LPP CDS	678	Exon 1 - 3 + 426 bp + 3 bp STOP-Codon	

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass bevorzugterweise humane HMG-Proteine sowie die dafür codierenden Nukleinsäuren verwendet werden. Infolge der Sequenzhomologie und des hohen Grades an Konservierung von HMG-Proteinen ist es jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass es sich bei den besagten Proteinen bzw. dafür codierenden Nukleinsäuren um solche handelt, die von anderen Organismen oder Arten als dem Menschen

stammen. Dabei sind insbesondere jene von anderen Säugetieren bevorzugt und hiervon wiederum ganz besonders jene von Hund, Katze, Maus, Ratte, Pferd, Rind und Schwein. Weitere Quellen für die erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteine sind solche von Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln. Besonders bevorzugt sind dabei Fische, insbesondere Salzwasserfische. Eine weitere bevorzugte Quelle sind Knorpel- und Knochenfische.

Die erfindungsgemäßen Anwendungen und Verwendungen der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine und der für sie codierenden Nukleinsäure, einschließlich deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte, erstreckt sich dabei auf eine Vielzahl von Prozessen. Bevorzugterweise sind die Prozesse jene, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung, Wundheilung, Geweberegeneration, Zellmobilität, Angiogenese, insbesondere Angiogenese im Wundbett, Epitelisierung, Gewebealterung, Vaskularisierung, insbesondere Vaskularisierung bei Herzinfarkt, Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten, Ent-Differenzierung von Zellen bzw. Geweben, Differenzierung von Zellen bzw. Geweben und Kombinationen von Ent-Differenzierungs- und Differenzierungsvorgängen umfasst. Die hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine und die für sie codierenden Nukleinsäuren weisen die Eigenschaft auf, einen oder mehrere der vorstehend genannten Prozesse zu initiieren, zu unterstützen, aufrecht zu erhalten und/oder fortzuführen, wobei es auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung liegt, die vorstehend genannten Prozesse durch auf der Grundlage der Nukleinsäuresequenzen von HMG-Genen erstellten Antisense-Molekülen, Ribozymen oder RNAi-Molekülen (hierin auch allgemein als funktionale Nukleinsäure bezeichnet) oder durch auf der Grundlage der hierin offenbarten Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen zu inhibieren. Die verschiedenen Prozesse können dabei gleichzeitig, aber auch zeitlich versetzt und gegebenenfalls überlappend unter Verwendung der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren durchgeführt werden. Ohne im folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, scheint es so, dass den hierin offenbarten Prozessen und bevorzugt den vorstehend genannten Prozessen gemein ist, dass die Grundlagen hierfür in einer Aktivierung der an den verschiedenen Prozessen beteiligten Zellen begründet liegen. Grundsätzlich sind all jene Vorgänge mit den besagten Proteinen sowie der für sie codierenden Nukleinsäuren, wie hierin definiert, adressierbar im Sinne von initiiierbar, anregbar, unterstützbar, aufrechterhaltbar und/oder verstärkbar. Die erfindungsgemäße Anwendung und Verwendung der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere

der hierin beschriebenen HMG-Proteine und der für die besagten Proteine codierenden Nukleinsäuren sowie der davon abgeleiteten Moleküle, insbesondere antisense-Moleküle, Ribozyme, RNAi-Moleküle bzw. der unter Anwendung der hierin beschriebenen Screening-Verfahren identifizierten Inhibitoren, insbesondere wie hierin definiert, erstreckt sich dabei auch auf jene Krankheiten, die mit einem oder mehreren der hierin beschriebenen Prozesse kausal oder symptomatisch verbunden sind, bzw. für die Herstellung entsprechender Medikamente, pharmazeutischer Formulierungen oder kosmetischer Formulierungen. Die besagte erfindungsgemäße Anwendung und Verwendung kann dabei eine *in vivo* und/oder *in vitro* und/oder *in situ* Verwendung sein. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese Anwendung bzw. Verwendung unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus hierin offenbart ist. Weiterhin im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist eine Verwendung der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine und der für sie codierenden Nukleinsäuren, einschließlich deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukten einschließlich der hierin offenbarten funktionalen Nukleinsäuren und der unter Anwendung der hierin offenbarten Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen, in Kombination mit bekannten angiogenetischen Faktoren wie beispielsweise VEGF in den bzw. betreffend die verschiedenen Aspekte, insbesondere Anwendungsaspekte der vorliegenden Erfindung.

Mit Hinblick das komplexe Zusammenspiel der oben beschriebenen Faktoren der Durchblutung, des Alters von im Wundbereich befindlichen Fibroblasten und der Epithelisierung der Wunde ist in einem Aspekt der Erfindung die Verwendung von Nukleinsäuren, Transkriptions- oder Translationsprodukten von Proteinen der HMGA-Familie zusammen mit Nukleinsäuren, Transkriptions- oder Translationsprodukten von Proteinen der HMGB-Familie vorgesehen. Ohne durch die Theorie festgelegt sein zu wollen, gehen die vorliegenden Erfinder davon aus, dass Nukleinsäuren, Transkriptions- oder Translationsprodukten von Proteinen der HMGA-Familie, einer im wesentlichen embryonal exprimierten Proteinfamilie, eine Entdifferenzierung oder „Verjüngung“ von Zellen und Geweben bewirken, die letztendlich auch das Proliferationspotential von Fibroblasten und die Migration von Epithelzellen erhöht. Nukleinsäuren, Transkriptions- oder Translationsprodukten von Proteinen der HMGB-Familie, insbesondere von HMGB1, lösen im wesentlichen eine Signalkette aus, die zur Angiogenese oder Neovaskularisierung führt. Diese unterschiedlichen Wirkungen von Angehörigen der

HMGA-Familie und der HMGB-Familie führen zu einem synergistischen Effekt hinsichtlich Angiogenese oder Neovaskularisierung und Wundheilung.

Bevorzugte Erkrankungen bzw. Krankheiten, zu deren Therapie und/oder Prävention die hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine und die dafür codierenden Nukleinsäuren, wie hierin definiert, sowie die hierin offenbarten funktionalen Nukleinsäuren und die unter Anwendung der hierin offenbarten Screening-Verfahren identifizierten Bindungen verwendet werden können bzw. die für die hierin offenbarten Medikamente oder pharmazeutischen Formulierungen verwendbar sind, sind insbesondere die folgenden: diabetische Retinopathie, proliferative Retinopathia diabetica, diabetische Nephropathie, Makuladegeneration, Arthritis, Psoriasis, Endometriose, Rosacea, Besenreiserarzen, eruptives Hämangiom, kavernöses Hämangiom, Lippenangiom, Hämangiosarkom, Hämorrhoiden, Arteriosklerose, Angina pectoris, Ischämie, Infarkt, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanom, Kaposi-Sarkom, Tumore, Gestose, Unfruchtbarkeit, Cornea-Erkrankungen, insbesondere Cornea-Erkrankung beim Menschen und beim Hund, insbesondere eine solche, die mit einer Angiogenese einhergehen, Pannus (chronische superfizielle Keratitis), Histiozytosen, bevorzugterweise akute Formen, bevorzugterweise in der Veterinärmedizin, primäre und sekundäre Wundheilung, gestörte primäre und sekundäre Wundheilung, chronische Wundheilung, akute Wunden und chronische Wunden, traumatisch bedingte Wunden, komplexe traumatische Defekte, thermische Verletzungen, thermische Verbrennungen, chemische Verletzungen, chemische Verbrennungen, Inzisionen, OP-Wunden, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetisches Ulcus, Dekubitalulcus, chronisch posttraumatische Wunden, chronischer Lichtschaden, Sonnenbrand (Dermatitis solaris) Hautkrebs, Hautkrebs nach Sonnenbrand, Hautalterung nach Sonnenbrand, Lederhaut, Xeroderma pigmentosum, Verbrennungen durch thermische Strahlung, insbesondere durch UV-Strahlung sowie eine jede dieser Erkrankungen bei besonderen Patientengruppen, wobei die Patientengruppen insbesondere ältere Personen, Personen mit Unterernährung, Personen mit Fehlernährung, Personen mit Diabetes, Personen mit Hautpigmentmangel, Personen mit Hypopigmentierung, Personen mit Hyperpigmentierung, Personen die einer Strahlentherapie unterzogen werden oder wurden und/oder Personen mit Nierenerkrankungen sind.

Ohne im Folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, scheint es so, dass der vorstehende Prozess der Reparatur von DNA-Schäden insoweit eine gewisse Sonderstellung innerhalb der vorstehend genannten Prozesse einnimmt, als dass dadurch Zellschäden behoben zu werden scheinen, die ansonsten in der Folge zu einem organischen Defekt führen können. Unter dem Einfluss der hierin beschriebenen basischen DNA-bindenden Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäure(n), kann somit die in der Regel natürlicherweise auftretende Reparatur von DNA-Schäden entsprechend unterstützt oder initiiert werden. Derartige DNA-Schäden entstehen insbesondere nach UV-Exposition, jedoch auch nach Exposition mit allgemein energiereicher Strahlung. Dazu gehört, unter anderem, auch radioaktive Strahlung, wie sie beispielsweise im Rahmen einer Strahlenbehandlung bei Tumorerkrankungen auftritt. Weitere Anwendungsfelder sind beispielsweise Strahlenschäden infolge eines Unfalls beim Umgang mit radioaktiven Substanzen. Der diesem Prozess zugrunde liegende Mechanismus der basischen DNA-Proteine und insbesondere der HMGA-Proteine scheint insoweit besonders vorteilhaft zu sein, als dass nicht auf einzelne Komponenten des Reparatursystems zurückgegriffen wird, sondern die einzelne Zelle vielmehr durch direkten Zugriff auf das Chromatin in den Stand versetzt wird, ihre eigenen Reparatursysteme zu aktivieren und somit die Grundlage für ein umfangreicheres Reparaturprogramm zur Beseitigung von DNA-Schäden schafft. Die entsprechende Anwendung kann dabei sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfolgen, mit dem Ziel, Zellmaterial zu erhalten bzw. wiederherzustellen, welches die DNA-Schäden nicht mehr oder aber zumindest im verringerten Umfang aufweist.

Bei der Angiogenese oder Neovaskularisierung ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese sich auf Gewebe oder Organe beziehen, die beispielsweise durch Explantation bereitgestellt werden. So können beispielsweise zur Implantation vorgesehene Gewebe oder Organe unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren zur Angiogenese oder Neovaskularisierung angeregt werden. Nach der Implantation haben solchermaßen behandelte Gewebe oder Organe höhere Chancen, aufgrund der bereits induzierten Angiogenese oder Neovaskularisierung in den Empfängerorganismus einzuwachsen und Zell- oder Gewebeschäden, die während der Explantationsphase entstanden sein können, zu begrenzen oder zu heilen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es auch vorgesehen, dass *in vitro*-gezüchtete Gewebe oder Organe zur Angiogenese oder Neovaskularisierung angeregt werden.

Bei der Zell- oder Geweberegeneration ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass solche Zellen oder Gewebe regeneriert werden, die im wesentlichen auch als Ausgangsmaterial verwendet werden. Wird beispielsweise im Rahmen der Wundheilung ein defektes Hautgewebe behandelt, wird es bevorzugterweise zur Regeneration von Hautgewebe kommen, was, ohne im Folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, im wesentlichen in den vorstehend beschriebenen Wirkungen der HMG-Proteine begründet liegt. Die Geweberegeneration oder Umprogrammierung der dabei beteiligten Zellen kann durch die Gabe externer Stimulanzien gefördert werden. Derartige Stimulanzien können beispielsweise durch das Gewebe bereitgestellt werden, in das die erfindungsgemäß re- oder umprogrammierte Zelle(n) eingebracht wird/werden. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass derartige Stimulanzien, insbesondere chemische Verbindungen, die als solche wirken oder wirken können, einzeln oder in Kombination, gegebenenfalls als entsprechende Vorstufe, mit der re- oder umprogrammierten Zelle in Kontakt gebracht werden, um die Richtung, in die sich die Zelle differenzieren oder umwandeln soll, zu beeinflussen.

Bei der Wundheilung spielen der angiogenetische bzw. neovaskularisierende Effekt, der proliferationsfördernde Effekt der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine, wie bereits vorstehend erwähnt, sowie eine Beschleunigung des Wundheilungsprozesses eine große Rolle. Von besonderem Vorteil ist bei Verwendung der besagten Proteine, die Art der Narbenbildung. Bei fetaler Wundheilung erfolgt eine ausgesprochen schnelle Wundheilung ohne Narbenbildung verglichen mit der postnatalen Heilung. Mit Blick darauf, dass unter Verwendung der besagten Proteine, insbesondere bei einer Kombination von Proteinen aus der HMGB- und aus der HMGA-Familie, eine aktive Wundheilung erfolgt, die den Prozess der fetalen Wundheilung widerspiegelt, tritt bei der erfindungsgemäßen Verwendung der besagten Proteine ein schneller und narbenfreier Wundverschluss auf. Ein wichtiger Aspekt bei einem jeden der Prozesse, bei denen die besagten Proteine erfindungsgemäß verwendet werden, ist dabei die Tatsache, dass das Risiko für Hautirritationen sowie allergische Reaktionen als äußerst gering eingestuft werden kann, da es sich bei den HMG-Proteinen um natürliche, körpereigene Substanzen handelt. Darüber hinaus sind die besagten Proteine von Mensch und Tier durch eine hohe Konservierung nahezu identisch, so dass die Resultate aus *in vivo*-Experimenten am Versuchstier eine hohe Übertragbarkeit am Menschen aufweisen. Es ist auch im Rahmen der Wundheilung, dass unter erfindungsgemäßer Anwendung der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine,

insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren die Transplantation eines Hautersatzes möglich wird, wobei es sich bei dem Hautersatz um einen solchen handelt, der ausgehend von autologen Hautzellen und ggf. deren Vermehrung erzeugt wird unter Verwendung der besagten Proteine als *in vitro*-Stimulationsfaktoren. Die hierzu erforderlichen autologen Hautzellen können beispielsweise aus Biopsien stammen. Typische Anwendungen sind dabei großflächige Verbrennungen oder Therapie-resistente chronische Ulzera. Auch hier, wie bei allen autologen Hautersatzverfahren, ist besonders vorteilhaft, dass keine Abstoßungsreaktion des Immunsystems hervorgerufen wird.

Mit der vorstehend beschriebenen komplexen Wirkungsweise der erfindungsgemäß verwendeten DNA-bindenden Proteine und insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren im Sinne der Gewährleistung einer ausreichenden Durchblutung des Wundbereiches erklärt sich auch deren Verwendung bei der Vaskularisierung bei Herzinfarkt. Unter dem Einfluss der erfindungsgemäß verwendeten DNA-bindenden Proteine und insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine kommt es zur Induktion der Proliferation von Endothelzellen, die die Angiogenese im Wundbett fördern und insoweit eine Versorgung des Herzmuskels mit Blutgefäßen gewährleisten. Gleiches gilt auch für die Anwendung im Rahmen der Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten. Dabei kommen auch die proliferationsfördernde Wirkung der erfindungsgemäß verwendeten DNA-bindenden Proteine und insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren einschließlich des Angiogenese-Effektes, wie er vorstehend beschrieben wurde, zum Tragen. Schließlich kommt insbesondere bei diesem Anwendungsaspekt die Wirkung zum Tragen, dass unter dem Einfluss der erfindungsgemäß verwendeten DNA-bindenden Proteine und insbesondere der hierin beschriebenen HMG-bindenden Proteine die Zellen in ihrer Motilität erhöht werden, so dass ein Um- und Einwachsen von Zahn- und Knochenimplantaten besonders gefördert wird.

Eine vorteilhafte Anwendung der hierin beschriebenen basischen DNA-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren findet sich auch bei der Beeinflussung der Gewebeerneuerung, die unter dem Einfluss der besagten Proteine verlangsamt bzw. aufgehoben wird. Eine weitere Anwendung findet sich dabei bei der Gewebeverjüngung, wobei es zwischen Verhinderung der Gewebeerneuerung und Gewebeverjüngung Überlappungen hinsichtlich der zugrundeliegenden biologischen Prozesse gibt, die jedoch durch die basischen DNA-bindenden Proteine bzw. durch

die dafür codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, beeinflussbar sind. Ohne im Folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, scheint dieser Effekt auf der Eigenschaft der besagten DNA-bindenden Proteine zu beruhen, die Zelle in einen Zustand zu versetzen, der dem einer jungen differenzierten bzw. fetalen Hautzelle sehr ähnlich ist. Damit werden die mit den besagten Proteinen behandelten Zellen einem Verjüngungsprozess bzw. einem Entdifferenzierungsprozess unterzogen, durch den die Zellen wieder in der Lage sind, sich zu erneuern. Vor allem die altersbedingte Verlangsamung und Verminderung der Zellerneuerung, die unter anderem durch hormonelle Veränderungen und erbliche Faktoren beeinflusst wird, kann durch die erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-bindenden Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren entgegengewirkt werden. Aber auch Schäden, die durch exogene Faktoren, wie z. B. freie Sauerstoffradikale, erzeugt werden, können durch eine durch die basischen DNA-Proteine, wie hierin beschrieben, induzierte aktive Zellregeneration vermindert, beseitigt oder in ihrer Entstehung verhindert werden. Insoweit wird mit den erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-Proteinen bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren eine präventive und/oder kausale und nicht nur primär eine symptomatische Therapie realisiert, die faktisch bereits vorhandenen Hautschäden durch Zellerneuerung entgegenzuwirken mag. Weiterhin erfolgt bei dem Prozess der Beeinflussung der Gewebeerneuerung unter erfindungsgemäßer Verwendung der besagten Proteine eine Aktivierung der Kollagenexpression, wodurch der Abnahme bzw. dem Verlust von Kollagen und somit der Hauptursache von Falten entgegengewirkt wird.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass anstelle der DNA-bindenden Proteine und insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine auch Nukleinsäuren, wie vorstehend beschrieben, die für diese codieren, in die jeweilige Zelle bzw. in das Gewebe eingeführt werden. Die solchermaßen behandelten Nukleinsäuren sind bevorzugterweise in einen Expressionsvektor eingebracht, der die Expression der Nukleinsäure in der jeweiligen Zelle bzw. dem von dieser mit aufgebautem Gewebe erlaubt, so dass intrazellulär die entsprechenden DNA-bindenden Proteine und insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine exprimiert werden. Die entsprechenden Expressionsvektoren für die jeweiligen Zellen sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und beispielsweise beschrieben in Colosimo A. et al. (2000) Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. Review. Biotechniques 29:314-331 bzw. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Geeignete virale Vektoren zur Expression von Genen leiten sich bspw.

aus inaktivierten Viren ab, wie bspw. Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Epstein-Barr-Viren, Herpes-Simplex-Viren, Papilloma-Viren, Polyoma-Viren, Retroviren, SV40 und Vaccinia-Viren. Geeignete Plasmid-Vektoren sind typischerweise aus prokaryotischen, eukaryotischen und/oder viralen Sequenzen zusammengesetzt. Beispiele hierfür sind insbesondere pTK2, pHyg , pRSVneo, pACT, pCAT, pCAT-basierte, pCI, pSI, pCR2.1, pCR2.1-basierte, pDEST, und pDEST-basierte. Den Fachleuten auf diesem Gebiet sind ebenfalls Verfahren bekannt, um die jeweilige DNA in die besagten Zellen bzw. Gewebe einzuführen, sei es dass die Einführung *in situ*, *in vivo* oder *in vitro* erfolgt. Zu den entsprechenden Verfahren gehören, unter anderem, PO₄-Präzipitation (CaPO₄, BES-CaPO₄, SRPO₄), kationische Polymere, Liposome, Molekulare Konjugate (z. B. Polylysin), Gramicidin S-DNA-Lipid Komplexe, Elektroporation, biolistische Genkanone (engl. „biolistic gene gun“), Mikroinjektion, rekombinante Viren und nackte DNA, wie beispielsweise beschrieben in Colosimo A. et al. (2000) Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. Review. Biotechniques 29:314-331 sowie Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Die gleiche Vorgehensweise kann auch verwendet werden, wenn es gilt, funktionale Nukleinsäuren, wie hierin definiert, vor einem zellulären Hintergrund, d. h. in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organ zu expremieren, insbesondere dann, wenn die funktionale Nukleinsäure die Expression, d. h. die Transkription bzw. die Translation der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine und insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine inhibiert.

Es ist somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Verwendung der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine und insbesondere der hierin beschriebenen HMG-Proteine, ersetzt werden kann durch eine dafür codierende Nukleinsäure, die zur Expression der besagten Proteine in einem Expressionssystem führen. Geeignete Expressionssysteme sind, u. a., Zellaufschlüsse, Zellen, Gewebe und/oder Organe.

Im erfindungsgemäßen Verfahren, insbesondere *in vitro*-Verfahren, zur Angiogenese oder Neovaskularisierung von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,

- b) Zugabe einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en) und
- c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en),

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für HMG-Proteine umfasst,

können die hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin beschriebenen HMG-Proteine bzw. entsprechende Nukleinsäuren verwendet werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, insbesondere *in vitro*-Verfahren, zur Regeneration von Gewebe umfasst die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt und
- c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst,

können die hierin beschriebenen DNA-bindenden basischen Proteine bzw. entsprechende Nukleinsäuren verwendet werden.

Bevorzugterweise handelt es sich bei dem bereitgestellten Gewebe um die Art von Gewebe, welches es zu regenerieren gilt. Gleichwohl ist es mit Blick auf den Wirkmechanismus der erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-Proteine nicht unbedingt erforderlich, dass eine Identität zwischen dem in diesem Schritt verwendeten, bereitgestellten Gewebe und dem

tatsächlich am Ende erhaltenen Gewebe besteht. So können beispielsweise aus Fettzellen Knorpelzellen oder aus Knorpelzellen Muskelzellen unter dem Einfluss der hierin beschriebenen HMG-Gene bzw. der hierin beschriebenen Proteine bzw. Polypeptide erzeugt werden. Ohne im folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, geht der vorliegende Erfinder davon aus, dass infolge der erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-bindenden Proteine die als Ausgangszelle(n) verwendeten Zelle(n) über einen Stammzell-ähnlichen Zustand in die jeweilige Zellart überführt wird/werden. Insoweit stellen die hierin beschriebenen Verfahren auch ein Verfahren zur Erzeugung von Quast-Stammzellen dar.

Die Bereitstellung eines Gewebes kann dabei beispielsweise durch Biopsie oder Explantation erfolgen.

Das Inkubieren des Gewebes mit einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, wie hierin beschrieben bzw. definiert, zu dem Gewebe oder einem Teil davon kann dabei so vorgenommen werden, dass eine Aufnahme des Translationsproduktes bzw. der Nukleinsäure oder deren Transkriptionsprodukt in eine oder mehrere Zellen des Gewebes erfolgt. Bevorzugterweise wird die Nukleinsäure hierzu in einer Form bereitgestellt, die eine Transfizierung einer oder mehrerer Zellen des Gewebes erlaubt. Geeignete Maßnahmen hierzu sind beispielsweise das Zugabe der Nukleinsäure bzw. deren Transkriptionsprodukt in Form eines bzw. das Inkubieren mit Hilfe eines Liposoms oder einer anderen Form, welche die Transfektion von Zellen mit Nukleinsäuren erlaubt. Die Translationsprodukte, insbesondere die erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteine können im Rahmen der Inkubation in die Zelle eingeführt werden unter Anwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren, so beispielsweise durch Elektroporation, Behandlung der Zellmembran mittels eines Bakteriotoxins, wie beispielsweise Streptolysin O oder Protein-Transduktions-Domänen und Peptid-Carrier.

Das vorstehend beschriebene erfindungsgemäße Verfahren zur Regeneration von Gewebe kann auch zur Reparatur von DNA-Schäden bzw. zur Unterstützung der Reparatur von DNA-Schäden in oder von Zellen verwendet werden bzw. stellt ein solches dar. Dabei wird insbesondere die Reparatur von DNA-Schäden in der Epithelschicht der Haut bedingt bzw. gefördert.

Die Elektroporation, bei der mit einem kurzen elektrischen Stromstoß (Puls) reversible Öffnungen (Poren) in einer Membran erzeugt werden können, wurde in den 70er Jahren erstmalig zum Einbringen von Xenomolekülen in Zellen genutzt. Durch die entstandenen Membranporen können sowohl niedermolekulare Substanzen (z. B. Farbstoffe und Peptide) als auch hochmolekulare Stoffe (z. B. Proteine, DNA und RNA) in Bakterienzellen sowie eukaryotischen Zellen eingeschleust werden. Da diese Methode jedoch im Verhältnis zu anderen Methoden eine relativ geringe Transporteffizienz aufweist, wird man im Rahmen bevorzugterweise einer klinischen Anwendung bevorzugterweise auf die im Folgenden beschriebenen Methoden und Agenzien zurückgreifen.

Membranen eukaryotischer Zellen lassen sich mittels eines Bakterientoxins, wie z. B. Streptolysin O permeabilisieren. Der Transfer von HMG-Proteinen in eukaryotische Zellen mit Hilfe von Streptolysin O (SLO) erfolgt durch Variationen in der Ca^{2+} -Konzentration: in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen erfolgt die Lyse der Zellen und durch die nachfolgende Zugabe von Ca^{2+} -Ionen können die Zellenporen wieder verschlossen werden. Um eine Reversibilität des Lysevorganges zu gewährleisten, wird die optimale SLO-Konzentration für jeden Zelltyp im Rahmen von den Fachleuten auf dem Gebiet bekannten Routineversuchen spezifisch ermittelt. Mit Hilfe dieser Methode werden die hierin offenbarten Wirkstoffe, d. h. die HMG-Proteine und die dafür codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, in beispielsweise Haut-Zellen geschleust, um z. B. das Wachstum von *in vitro* kultivierten autologen Keratinozyten zu stimulieren. Hochproliferative Zellen können auf diese Weise Patienten mit chronischen Wunden bzw. Verbrennungspatienten als Transplantat zur Verfügung gestellt werden.

Liposomen wurden erstmals 1961 für Studien zum Ionentransport durch die Zellmembran eingesetzt und wurde später als ein nützliches Transportmittel für Medikamentenwirkstoffe entdeckt. Während jedoch die systemische Anwendung von in Liposomen eingekapselten Medikamenten bislang nur wenige Erfolge brachte, eröffnet die topische Applikation von Liposomen in der Dermatologie neue Chancen. Darüber hinaus werden inzwischen auch Kosmetika auf Liposomenbasis in den vereinigten Staaten und Westeuropa vermarktet. Insoweit stellen Liposomen besonders bevorzugte Applikationsformen für die Verabreichung der HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren dar, insbesondere im Falle der hierin beschriebenen Herstellung von Medikamenten und Produkten zur äußerlichen Auftragung.

Liposomen sind Mycellen, die in ihrem Aufbau der Doppellipidschicht der Zellmembran gleichen und somit, wenn man sie im Überschuss zugibt, mit den Zellen verschmelzen. Vorher in die hydrophile Phase der Liposomen eingebrachte bzw. verkapselte Wirkstoffe können daher in der Zelle freigegeben werden. Die Klassifikation von Liposomen basiert auf ihrer Größe und auf der Anzahl der Lipiddoppelschichten. Es gibt große Vesikel (von 0,1 bis $>10\ \mu\text{m}$) mit mehreren Lipiddoppelschichten (multilammellar large vesicles = MLV), große Vesikel ($\geq 0,06\ \mu\text{m}$) mit einer Lipiddoppelschicht (large unilamellar vesicles) und kleine Vesikel ($0,02 - 0,05\ \mu\text{m}$) mit einer Lipiddoppelschicht (small unilamellar vesicles). Über die Anzahl der Lipiddoppellayer kann bis zu einem gewissen Grad die quantitative Freilassung oder Freisetzung des Wirkstoffes in der Zelle gesteuert werden. Desweiteren kann über den Einbau von z. B. Ceramiden anstelle der Phospholipidkomponenten, d. h. Strukturen, die denen der Membranstrukturen von Keratinozyten ähneln, die Kompatibilität zwischen Liposomen und der Haut erhöht werden. Diese Methode eignet sich daher besonders für ein topisch zu applizierendes Präparat mit einem Wirkstoff auf der Basis der hierin beschriebenen HMG-Proteine und der dafür codierenden Nukleinsäuren. Aufgrund der geringen Größe der HMG-Proteine, insbesondere der HMGA-Proteine ($<12\ \text{kDa}$), eignen sich diese darüber hinaus besonders gut für eine Verpackung in Liposomen.

Protein Transduktions Domänen (PTD) und Peptid-Carrier stellen eine effiziente Möglichkeit dar, um die erfindungsgemäß verwendeten Proteine in Zellen zu schleusen. PTDs sind im Allgemeinen kurze Peptide von 10 - 16 Aminosäuren (meist positiv geladene Lysin und Argininreste), die kovalent mit dem zu transportierenden Protein verbunden sind. Die PTD-vermittelte Transduktion erfolgt über einen bislang wenig bekannten Mechanismus, der unabhängig von Rezeptoren, Transportern und der Endocytose ist. Mit Hilfe der PTDs konnten bereits Proteine mit einer Größe von bis zu 700 kDa in Zellen geschleust werden. Desweiteren sind die PTDs insbesondere für den Transport von Medikamentenwirkstoffen wie den erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteinen und den sie codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, geeignet, da bereits die *in vivo*-Transduktion von Proteinen in Geweben und Zellen nachgewiesen werden konnte. Durch die kovalente Bindung der PTDs an die zu übertragenden Proteine ist diese Technologie jedoch hinsichtlich einer vollständig zu erhaltenden Funktionalität des zu transportierenden Wirkstoffes bedingt limitiert. Bevorzugterweise wird auch deshalb in bevorzugten Ausführungsformen auf nicht-kovalente Peptid Carrier zurückgegriffen, wie z. B. dem Chariot Reagenz (Carlsbad). Dieses Protein Transport System

beruht auf einem kurzen synthetischen Signalpeptid (Pep-1), das sich mit dem zu transportierenden Protein über nichtkovalente hydrophobe Interaktionen komplexiert. Innerhalb der Zelle dissoziiert das transportierte Protein von dem Pep1-Peptid und wird durch zelluläre Transportmechanismen weiter zu der vorhergesehenen intrazellulären Lokalisation transportiert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die hohe Effizienz des Transportes von – je nach Zelltyp und Protein – 60 - 95 %. Diese Methode eignet sich damit sowohl für den Einsatz im Rahmen der durch die HMG-Proteine vermittelten Proliferationsförderung bei *in vitro* kultivierten autologen Haut-Zellen als auch im Rahmen eines topisch zu applizierenden entsprechenden Präparates mit einem oder mehreren der hierin beschriebenen Wirkstoffen.

Die Inkubation des Gewebes mit der Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt erfolgt dabei unter Bedingungen, die eine Aufnahme derselben in die Zelle bzw. das Gewebe erlaubt. Bevorzugterweise erfolgt die Inkubation bei 37°C unter physiologischen Bedingungen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, insbesondere ein *in vitro*-Verfahren, zur Differenzierung, Entdifferenzierung und/oder Reprogrammierung von Zellen umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen einer oder mehrerer Zellen,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, und
- c) Inkubieren der Zelle und der Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt wie im Zusammenhang mit den anderen Aspekten oben ausgeführt ausgewählt sein kann/können.

Auch hier gilt hinsichtlich der Durchführung der einzelnen Schritte das im Zusammenhang mit dem hierin beschriebenen Verfahren zur Regeneration von Gewebe Gesagte sinngemäß. Obwohl nicht darauf beschränkt kann die bereitgestellte Zelle grundsätzlich eine jede, insbesondere mesenchymale Zelle wie beispielsweise eine Fettzelle, Knorpelzelle oder Muskelzelle sein.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Formulierung, welche eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e), deren Translationsprodukt(e), die funktionalen Nukleinsäuren und die unter Anwendung der erfindungsgemäßen Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen, wie hierin beschrieben und einen pharmazeutisch geeigneten Träger umfasst. Eine pharmazeutische Formulierung kann dabei eine solche sein, die für die verschiedenen Formen der Applikation ausgebildet ist. Derartige Applikationsformen schließen insbesondere die topische Applikation und die subkutane Applikation ein. Gleiches gilt für die kosmetische Formulierung gemäß der vorliegenden Erfindung. Als geeignete pharmazeutische Träger oder auch kosmetische Träger, wie beispielsweise in der Verordnung über kosmetische Mittel vom 19. Juni 1995 für die Bundesrepublik Deutschland geregelt, können die folgenden einzelnen oder in beliebiger Kombination verwendet werden: Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika, Alkohole, Basen, Säuren, Stärke, Feuchthaltemittel, Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogege, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierungen können dabei neben den erfindungsgemäß verwendeten DNA-bindenden Proteine, insbesondere den hierin beschriebenen HMG-Proteinen bzw. der/den dafür codierenden Nukleinsäure(n) oder den von der Nukleinsäuresequenz dieser Proteine abgeleiteten inhibitorisch wirkenden Nukleinsäuren wie Antisense-Nukleinsäuren, Ribozyme oder RNAi noch weitere Wirkstoffe enthalten. Pharmazeutische oder kosmetische Formulierungen, die mindestens ein HMG-Protein bzw. eine dafür codierende Nukleinsäure enthalten, sind insbesondere Salben, Cremes und Gele.

Der vorliegenden Erfindung liegt weiterhin die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass die hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere die hierin beschriebenen HMG-Proteine, einen spontanen Transfer in tierische Zellen, insbesondere Epithelzelle und ganz besonders bevorzugt in menschliche Epithelzellen zeigen. Infolge dessen ist es möglich, die besagten Proteine direkt auf eine mit Zellen bedeckte Oberfläche, insbesondere auf die zu behandelnden Zellen, aufzutragen, die sodann die besagten Proteine spontan aufnehmen. Bevorzugterweise befinden sich dabei die Proteine in einem Trägermedium, welches diesen

spontanen Transfer fördert. Derartige Transfermedien sind beispielsweise wässrige oder alkoholische Lösungen oder geeignete Emulsionen oder andere Phasen oder Phasengemische. Dieses überraschende Verhalten der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine, insbesondere der HMG-Proteine erlaubt deren direkte Verwendung in pharmazeutischen und/oder kosmetischen Formulierungen, wobei keine besonderen weiteren Maßnahmen, wie beispielsweise die Verwendung von Streptolysin zur Aufnahme der Proteine in die zu behandelnde Zelle, erforderlich sind.

Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en) sowie der hierin offenbarten funktionalen Nukleinsäuren und der unter Anwendung der erfindungsgemäßen Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen oder damit erstellten pharmazeutischen Formulierungen können jegliche im Stand der Technik bekannte Applikationsmethoden eingesetzt werden. Beispielsweise kann über Injektionsspritzen eine intradermale, subkutane intramuskuläre oder intravenöse bzw. intraarterielle Applikation vorgenommen werden, bzw. eine Applikation kann direkt in das Zielgewebe erfolgen. Ebenfalls verwendet werden können Kathetersonden oder eine direkte Auftragung eines freigelegten Zielgewebes. Die jeweils verwendete Applikationsmethode wird sich normalerweise nach dem Zielgewebe richten. Soll beispielsweise eine Revaskularisierung von Herzmuskelgewebe erreicht werden, wird eine Applizierung einer erfindungsgemäßen Formulierung über Katheter, Kanülen oder ein Kombinationsinstrument bevorzugt sein, das beispielsweise im Rahmen der TMLR auch die Verabreichung von Laserstrahlen ermöglicht. Soll beispielsweise Hautgewebe erreicht werden, beispielsweise zur Förderung der Angiogenese beispielsweise im Sinne einer Verbesserung von Wundheilung durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren deren Transkriptions- oder Translationsprodukte bzw. zur Inhibierung von Angiogenese beispielsweise im Falle von Hämangiomen oder Besenreiseräven durch von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren abgeleiteten inhibitorischen Molekülen wie Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen oder RNAi oder im Rahmen von Screening-Verfahren gefundenen inhibitorischen Substanzen, dann kann beispielsweise eine intradermale oder subkutane Verabreichung oder auch eine topische Auftragung in Form von Cremes angezeigt sein. Es liegt innerhalb des Könnens des Fachmanns, geeignete Verabreichungsmethoden auszuwählen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Zellen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind sowie Gewebe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung Trägermaterial, welches eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e), deren Translationsprodukt(e), eine oder mehrere der hierin beschriebenen funktionalen Nukleinsäuren und/oder eine oder mehrere der hierin unter Anwendung der erfindungsgemäßen Screening-Verfahren identifizierten Verbindungen umfasst, wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) solche, wie sie hierin beschrieben sind, darstellen können. Das Trägermaterial wird insbesondere als Implantat oder als Abdeckmaterial, bevorzugt zur Wundheilung aber auch für eine jegliche andere der hierin beschriebenen Erkrankungen oder Zustände oder die anderen, hierin beschriebenen Anwendungen, die mit der Bereitstellung einer Oberfläche, an bzw. auf der die basische DNA-bindenden Proteine, wie hierin beschrieben, kovalent oder nicht-kovalent gebunden sind oder werden, verbunden sind, verwendet. Grundsätzlich sind jegliche Materialien hierzu verwendbar, die für Implantatmaterialien oder als Abdeckmittel bzw. Trägermaterial für die Wundheilung oder die anderen, hierin beschriebenen Anwendungen, die mit der Bereitstellung einer Oberfläche, an bzw. auf der die DNA-bindenden Proteine, insbesondere HMG-Proteine, wie sie hierin beschrieben sind, kovalent oder nicht-kovalent gebunden sind oder werden, verbunden sind, wie sie im Stand der Technik bekannt sind, bereits verwendet werden, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt Hydrokolloide, Hydrogele, Hydropolymere, Schaumverbände, Kalziumalginate, Aktivkohle, Schaumstoff, Folien, Silikonschaum, Fleecestoffe, Kunstseide, Baumwollgase, Kautschuk, Paraffin und Paraffingase. Geeignete Kunststoffe sind dabei Polyethylene, Polyvinylene, Polyamide und Polyurethane. Die erfindungsgemäß verwendeten Nukleinsäuren und DNA-bindenden Proteine, insbesondere HMG-Proteine sind bevorzugterweise an dem Trägermaterial in nicht-kovalenter Art und Weise absorbiert. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese kovalent gebunden sind und/oder unter den jeweiligen Anwendungsbedingungen eine Freisetzung derselben von dem eigentlichen Trägermaterial erfolgt. Geeignete Anwendungsmöglichkeiten sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt. Eine besondere Form des Trägermaterials ist das Wundabdeckmaterial, welches aus einem Basisdeckmaterial und einer oder mehreren Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren

Translationsprodukt(en) besteht, wobei diese wie hierin beschrieben ausgestaltet sind. In diesem Falle kann das Basisdeckmaterial ein Trägermaterial im hierin beschriebenen Sinne darstellen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung, wobei die Verbindung der Förderung und/oder der Inhibierung eines Prozesses dient. Der Prozess kann dabei ein jeder der Prozesse, einzeln oder in beliebigen Kombinationen, sein, wie sie hierin beschrieben sind, insbesondere kann der Prozess ausgewählt sein aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Reparatur von Hautschäden, Angiogenese, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Veränderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung, Neovaskularisierung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst. Weiterhin kann der Prozess ganz allgemein ein solcher sein, welcher die Umprogrammierung, Umdifferenzierung oder Entdifferenzierung, gegebenenfalls mit anschließender erneuter Differenzierung, umfasst. Ohne im Folgenden hierauf festgelegt sein zu wollen, ist es den Prozessen, wie sie hierin beschrieben sind, scheinbar zu eigen, dass diese mit dem Übergang zumindest einer Zelle in einen Quasi-Stammzell-Charakter verbunden sind, auf der Grundlage dessen bzw. ausgehend von welchem eine erneute Differenzierung der Zelle erfolgt.

Im einfachsten Falle sieht das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen einer Verbindung vor, dass die folgenden Schritte realisiert werden:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem System verursachten Reaktion.

Bei einem Testsystem handelt es sich bevorzugterweise um ein solches, welches erlaubt, den jeweiligen Prozess darzustellen, insbesondere darzustellen unter dem Einfluss einer Verbindung, von der vermutet wird, dass sie den Prozess entweder fördert oder inhibiert, einer sogenannten Kandidaten-Verbindung, und/oder unter dem Einfluss einer Referenz-Verbindung. Derartige Systeme sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Bevorzugterweise umfasst ein derartiges

Testsystem eine oder mehrere Zellen, gegebenenfalls ein Gewebe oder Gewebe, die die besagte(n) Zelle(n) enthalten, wobei das Verhalten der Zellen bzw. des Gewebes untersucht wird. Das Verhalten ist dabei insbesondere einer oder mehrere der folgenden Prozesse: Wachstum der Zellen bzw. des Gewebes, Differenzierung der Zelle bzw. des Gewebes, und die verschiedenen Facetten oder Aspekte davon, wie beispielsweise, aber nicht darauf beschränkt, Ent-Differenzierung und Differenzierung, bevorzugterweise erneute Differenzierung, Wanderung von Zellen, Ausschüttung von Signalmolekülen, Angiogenese oder Neovaskularisierung von Geweben. Neben dem direkten Wachstum können dabei auch andere Phänomene oder Parameter verwendet werden, um eine Reaktion des Testsystems zu beschreiben. Derartige Parameter können beispielsweise biochemische, genetische, molekulargenetische, molekularbiologische, histologische, zytologische, physiologische und phänotypische Parameter sein. Biochemische Parameter können beispielsweise Stoffwechselwege, typische Edukte ebenso wie Produkte davon sein, die mit den besagten Prozessen direkt oder indirekt verbunden sind. Genetische und molekulargenetische Parameter sind dabei bevorzugt solche, die auf der Ebene der Nukleinsäure, sowohl genomische Nukleinsäure als auch hnRNA, mRNA und dergleichen, mit den besagten Prozessen verbunden sind. Dabei kann es im Rahmen der vorliegenden Erfindung sein, dass als genetischer Parameter das Auftreten einer entsprechenden Nukleinsäure gemessen wird, das Verschwinden einer entsprechenden Nukleinsäure, oder deren quantitative Veränderung bei der Förderung bzw. Inhibierung der besagten Prozesse. Mit molekularbiologischen Parametern können u.a. Proteine über deren Auftreten und Verschwinden mit den besagten Prozessen verbunden sein. Physiologische Parameter können dabei das Verhalten, insbesondere das Ansprechverhalten, der Zellen bzw. des Gewebes sein auf Reize, wie beispielsweise biologische, chemische oder physikalische Reize, die von dem jeweiligen Testsystem, d. h. den Zellen bzw. dem Gewebe in Abhängigkeit von dem Prozess bzw. dessen Förderung oder Inhibierung unterschiedlich beantwortet werden.

In einer Ausführungsform ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung derartiger Prozesse vorgesehen, dass neben einem entsprechenden Testsystem für den Prozess eine Referenz-Verbindung bereitgestellt wird und die Referenz-Verbindung mit dem Testsystem in Kontakt gebracht wird, d. h. die Referenz-Verbindung im Testsystem getestet wird. Dieses Kontaktieren erfolgt bevorzugterweise dadurch, dass die Referenz-Verbindung, bevorzugterweise in Form einer Lösung, bevorzugterweise in

Lösung in einem Puffer vorliegend, mit dem Testsystem in Verbindung gebracht wird, bevorzugterweise dem Kulturmedium hinzugesetzt wird. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass das Inkontaktbringen der Referenz-Verbindung mit dem Testsystem ortsspezifisch erfolgt, beispielsweise die Referenz-Verbindung in bestimmte Zellen des Gewebes oder aber auch in bestimmte Kompartimente der Zelle(n) eingebracht wird. Die Zell-spezifische ebenso wie die Kompartiment-spezifische Verabreichung derartiger Referenz-Verbindungen sind den Fachleuten auf dem Gebiet grundsätzlich bekannt. Es können z.B. Referenz-Verbindungen über Mikroinjektion, in definierte Bereiche bzw. Kompartimente der Zelle injiziert werden wie beispielsweise beschrieben in Wang B et al (2001) Expression of a reporter gene after microinjection of mammalian artificial chromosomes into pronuclei of bovine zygotes. Mol Reprod Dev 60:433-8. Zudem stehen Verfahren zur Verfügung, Referenz-Verbindungen z.B. über Aminosäuretransporter zu behandeln oder zu modifizieren, so dass die Referenz-Verbindungen spezifische Zellen, wie z.B. Fibroblasten, wie beispielsweise beschrieben in Palacin M et al. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. Physiol Rev 78:969-1054, oder spezifische Zellkompartimente, wie z.B. den Nukleus, wie beispielsweise beschrieben in Chaloin L et al. (1998) Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and nuclear localization properties. Biochem Biophys Res Commun 243:601-608, oder die Mitochondrien, wie beispielsweise beschrieben in Pain D et al. (1991) Machinery for protein import into chloroplasts and mitochondria. Genet Eng (N Y) 13:153-166., erreichen. Die Zell-spezifische oder die Kompartiment-spezifische Verabreichung kann auch für die Kandidaten-Verbindung, wie hierin beschrieben, erfolgen.

In einem nächsten Schritt erfolgt eine Bestimmung der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion. Dabei können wiederum bevorzugterweise die vorstehend genannten Parameter verwendet werden, um den Einfluss der Referenz-Verbindung im Testsystem zu bestimmen. In einem weiteren Schritt dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse wird sodann die Kandidaten-Verbindung bereitgestellt und diese, ähnlich wie die Referenz-Verbindung, in dem Testsystem getestet. Anschließend erfolgt die Bestimmung der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion, wobei grundsätzlich die im Zusammenhang mit der Referenz-Verbindung besprochenen Parameter herangezogen werden können. Schließlich wird die Reaktion des

Testsystems, ausgedrückt durch die vorstehend genannten Parameter, unter dem Einfluss der Referenz-Verbindung mit dem Verhalten des Testsystems unter dem Einfluss der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verglichen. Dabei wird eine Kandidaten-Verbindung als eine Verbindung zur Förderung eines oder mehrerer der besagten Prozesse bezeichnet, wenn der jeweilige Prozess unter dem Einfluss der Kandidaten-Verbindung die gleiche Reaktion oder eine stärkere Reaktion in dem Testsystem hervorruft als die Referenz-Verbindung. Umgekehrt ist eine Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Inhibierung eines oder mehrerer der besagten Prozesse, wenn die Kandidaten-Verbindung im Testsystem eine Reaktion hervorruft, die geringer ist als die entsprechende Reaktion der Referenz-Verbindung. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass ein und dieselbe Kandidaten-Verbindung durchaus unterschiedliche Wirkungen im Sinne von Inhibierung bzw. Förderung für einen Prozess gegenüber einem anderen der vorstehend genannten Prozesse zeigt. Weiterhin ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die zeitliche Abfolge des Testens der Referenz-Verbindung und der Kandidaten-Verbindung auch umgekehrt werden kann.

In einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse wird wiederum ein Testsystem für den Prozess bereitgestellt und anschließend eine Referenz-Verbindung. In dieser Ausführungsform ist die Referenz-Verbindung sodann mit einer Markierung versehen. Grundsätzlich sind jegliche Markierungen geeignet, insbesondere solche, welche eine radioaktive, fluoreszierende, immunologische, Enzym- oder Affinitäts-Markierung umfasst bzw. eine solche erlaubt. Radioaktive Markierungen sind dabei insbesondere ^1H , ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , ^{51}Cr , ^{13}C und ^{14}C , Fluoreszenzmarkierungen umfassen dabei Markierungen mit Fluorescein, Fluorescamin, Isocyanat, Luciferase, Rhodamin, Texas Red, Cy3 und Cy5. Zu den immunologischen Markierungen gehören neben diversen Immunogenen u.a. die Immunglobuline IgM, IgA, IgD, IgE und IgG, inklusive, aber nicht darauf beschränkt, IgG1, IgG2a und IgG2b. Enzym-Markierungen umfassen insbesondere die alkalische Phosphatase und die Peroxidase. Zu den Affinitätsmarkierungen gehören GST- und His-Tag-Markierungen sowie Markierungen über Biotin und Digoxigenin. Bevorzugterweise wird die Markierung eine solche sein, welche die Reaktion, die die Referenz-Verbindung im Testsystem verursacht, nicht nachteilig beeinflusst. Eine solchermaßen markierte Referenz-Verbindung wird sodann, wie vorstehend beschrieben, im Testsystem getestet und die von ihr verursachte Reaktion im Testsystem bestimmt. In einem weiteren Schritt wird sodann eine Kandidaten-Verbindung bereitgestellt und auch diese im

Testsystem wie vorstehend geschildert getestet, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung während des Testens der durch die Kandidaten-Verbindung verursachten Reaktion enthält. Dabei ist bevorzugt, dass das Testen unter Bedingungen erfolgt, die gewährleisten, dass die Referenz-Verbindung nach wie vor biologisch aktiv ist, d. h. die fördernde bzw. inhibierende Wirkung zeigt. Nach Zugabe der Kandidaten-Verbindung wird die Reaktion des Testsystems wiederum bestimmt, wobei es grundsätzlich möglich ist, dass die vorstehend beschriebenen biochemischen Parameter herangezogen werden. Bevorzugterweise wird in Ergänzung dazu oder alternativ dazu die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung mittels der entsprechenden Markierung oder aber die freigesetzte Markierung als solches bestimmt.

In einem noch weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse ist vorgesehen, dass eine Markierung der Kandidaten-Verbindung erfolgt. In einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, dass die Kandidaten-Verbindung bereitgestellt wird und anschließend das Testsystem getestet wird und die von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion bestimmt wird mit anschließender Bereitstellung einer Referenz-Verbindung, gefolgt vom Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, insbesondere unter Bedingungen, die gewährleisten, dass die Referenz-Verbindung physiologisch aktiv ist, und die Reaktion des Testsystems bestimmt, wobei insbesondere die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird. Alternativ, aber auch in Ergänzung dazu, können die besagten Parameter bestimmt werden, wie vorstehend beschrieben, um die Reaktion sowohl der Referenz-Verbindung als auch der Kandidaten-Verbindung auf den jeweiligen Prozess zu charakterisieren. Es ist dabei auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, wenn die Reihenfolge der Zugabe von Kandidaten-Verbindung und Referenz-Verbindung, unabhängig davon, welche der Verbindungen mit einer Markierung versehen ist, umgekehrt wird. Im ersten der beiden vorstehend beschriebenen Verfahrensweisen verdrängt die Referenz-Verbindung die Kandidaten-Verbindung, im zweiten Falle verdrängt die Kandidaten-Verbindung die Referenz-Verbindung. Schließlich ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass bei den verschiedenen Aspekten der erfindungsgemäßen Screening-Verfahren, bei denen eine Markierung entweder der Kandidaten-Verbindung oder der Referenz-Verbindung vorliegt, hierin auch als erste Markierung bezeichnet, auch die jeweils andere Verbindung eine

Markierung trägt, im folgenden auch als zweite Markierung bezeichnet, wobei die erste und die zweite Markierung bevorzugterweise voneinander verschieden sind.

Im Rahmen einer jeglichen der erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse ist dabei vorgesehen, dass die Referenz-Verbindung eine Nukleinsäure, oder deren Transkriptionsprodukt oder deren Translationsprodukt, gegebenenfalls eine Kombination derselben, ist, wobei die Nukleinsäure eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Gene für DNA-bindende Proteine und HMG-Proteine umfasst. Besonders bevorzugte DNA-bindende Proteine und HMG-Proteine sind dabei jene, wie sie hierin beschrieben sind, insbesondere jene gemäß SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 30 bzw. die für Proteine codierenden Nukleinsäuren gemäß SEQ ID No. 31 bis 64 und jene, wie sie in den Tabellen 1 bzw. 2 dargestellt sind.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass im Rahmen der verschiedenen Anwendungen bzw. Verwendungen ein einzelnes der hierin beschriebenen DNA-bindende Proteine und HMG-Proteine und/oder eine einzelne dafür oder für eines der hierin beschriebenen DNA-bindende Proteine und HMG-Proteine codierende Nukleinsäure verwendet wird. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine Mischung aus zwei oder mehreren der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren verwendet werden. Es ist weiterhin im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Begriffe Protein und Peptid bzw. Polypeptid hierin synonym verwendet werden.

Ein weitere Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-bindenden Proteinen, insbesondere HMG-Proteinen bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren und bevorzugterweise der mit ihnen in Wechselwirkung tretenden Moleküle, die bevorzugterweise diese antagonisieren, um bestimmte biologische Prozesse zu inhibieren. Aufgrund dieser Inhibierung ist die Prävention oder Behandlung von Krankheiten möglich, die mit diesen Prozessen kausal oder symptomatisch in Beziehung stehen. Derartige Krankheiten umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis, die hierin auch als „vorstehend genannte Erkrankungen“ bezeichnet werden. Bei den vorstehend genannten Erkrankungen kann es sich dabei sowohl um entsprechende Erkrankungen des Menschen als auch um entsprechende Erkrankungen von Tieren handeln, insbesondere von Haustieren, Zootieren, Nutztieren und

dergleichen handeln. DNA-bindende Proteine und insbesondere HMG-Proteine, wie mit diesem und anderen Aspekten diskutiert, umfassen alle derartigen Proteine, insbesondere die hierin beschriebenen HMG-Proteine, HMG-Peptide und Fragmente davon sowie die jeweils dafür codierende Nukleinsäure. Sofern nicht explizit hierin anders angegeben, bezeichnen Proteine auch Polypeptide und umgekehrt. Insbesondere bezeichnet der Begriff HMG-Proteine auch HMG-Peptide und Fragmente davon.

Infolge dieser kausalen Zusammenhänge betrifft ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung Mittel zur Prävention und/oder Behandlung der vorstehenden Erkrankungen. Derartige Mittel sind bevorzugterweise solche, die die Wirkung der DNA-bindenden Proteine, insbesondere der HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren inhibieren bzw. antagonisieren. Entsprechende Mittel sind Polypeptide, die an DNA-bindenden Proteine, insbesondere der HMG-Proteine oder dafür codierende Nukleinsäuren binden, ebenso wie Antikörper, die an DNA-bindenden Proteine, insbesondere der HMG-Proteine oder dafür codierende Nukleinsäuren binden. Weitere Mittel, die zur Prävention oder Behandlung dieser Erkrankungen eingesetzt werden können, sind siRNA oder RNAi, Aptamere, Spiegelmere, Antisense-Moleküle und Ribozyme. Insoweit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung derartiger Mittel zur Herstellung von Medikamenten, insbesondere Medikamenten zur Behandlung der vorstehend genannten Erkrankungen.

Die vorstehend genannten Mittel können von den Fachleuten auf dem Gebiet im Rahmen ihrer Kenntnisse hergestellt werden. Als Zielmolekül bzw. Grundlage für die Herstellung dient dabei ein jegliches hierin offenbartes DNA-bindende Protein, insbesondere HMG-Protein, Fragment davon oder eine für das Protein oder Fragment davon codierende Nukleinsäure, wie insbesondere hierin auch offenbart. Dabei ist besonders bevorzugt, dass es sich bei dem Protein um HMGB1 handelt sowie Teile davon, insbesondere die A-Domäne von HMGB1. Bei den erfindungsgemäßen Mitteln, die erfindungsgemäß zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung und/oder Prävention der vorstehend genannten Erkrankungen verwendet werden können, handelt es sich somit um einen Antikörper gegen DNA-bindende Proteine, insbesondere HMG-Proteine oder Fragmente davon, Peptide, die an DNA-bindenden Proteinen, insbesondere HMG-Proteine oder Fragmente davon binden, siRNA, die gegen mRNA von DNA-bindenden Proteinen, insbesondere HMG-Proteinen oder Fragmenten davon gerichtet ist, Antisense-Moleküle, die gegen die für DNA-bindende Proteine, insbesondere HMG-Proteine oder

Fragmente davon codierenden Nukleinsäuren, insbesondere mRNA oder hnRNA, gerichtet sind, Antisense-Moleküle, die gegen für DNA-bindende Proteine, insbesondere HMG-Proteine oder Fragmente davon codierenden Nukleinsäuren, insbesondere mRNA oder hnRNA, gerichtet sind, Ribozyme, die gegen DNA-bindende Proteine, insbesondere HMG-Proteine oder Fragmente davon codierenden Nukleinsäuren, insbesondere mRNA oder hnRNA, gerichtet sind. Weiterhin sind die Mittel Aptamere und Spiegelmere, die gegen ein DNA-bindendes Protein, insbesondere ein HMG-Protein oder ein Fragment davon oder gegen eine dafür codierende Nukleinsäure gerichtet sind.

Antikörper, wie hierin verwendet, sind bevorzugterweise monoklonale Antikörper, die gemäß dem Protokoll von Cäsar und Milstein und Weiterentwicklungen davon hergestellt werden können. Antikörper sind dabei auch Antikörperfragmente oder -derivate, wie bspw. Fab-Fragmente, Fc-Fragmente aber auch einzelsträngige Antikörper, solange diese generell in der Lage sind, HMGB spezifisch zu binden. Neben monoklonalen Antikörpern können auch polyklonale Antikörper verwendet werden. Ein polyklonaler Antikörper für die Grundlagenforschung, der grundsätzlich auch als Medikament verwendet werden könnte, ist bspw. der gegen HMGB1 gerichtete Antikörper sc-12523 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Bevorzugterweise sind die verwendeten Antikörper humane oder humanisierte Antikörper.

Peptide oder Polypeptide, die mit einem DNA-bindenden Protein, insbesondere einem HMG-Protein oder einer dafür codierenden Nukleinsäure in Wechselwirkung treten, können mit im Stand der Technik bekannten Verfahren wie beispielsweise Phage-Display gescreent werden. Diese Techniken sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Dabei wird bei der Erzeugung derartiger Peptide typischerweise so vorgegangen, dass eine Peptid-Bibliothek angelegt wird, bspw. in Form von Phagen, und diese Bibliothek in Kontakt gebracht wird mit einem Zielmolekül, d. h. einem einem DNA-bindenden Protein, insbesondere einem HMG-Protein, bevorzugterweise mit HMGB1. Die bindenden Peptide werden sodann typischerweise als Komplex zusammen mit dem Zielmolekül von den nicht bindenden Mitgliedern der Bibliothek entfernt. Es ist dabei im Rahmen der Kenntnisse der Fachleute auf diesem Gebiet, dass die Bindungseigenschaften zumindest bis zu einem bestimmten Umfang von den jeweils konkret vorliegenden Versuchsbedingungen, wie bspw. Salzgehalt und dergleichen, abhängen. Nach Abtrennen der mit einer höheren oder stärkeren Affinität oder Kraft an das Zielmolekül

bindenden Peptide von den nicht-bindenden Mitgliedern der Bibliothek bzw. vom Zielmolekül können diese sodann charakterisiert werden. Gegebenenfalls ist vor der Charakterisierung ein Amplifikationsschritt, bspw. durch Vermehrung der entsprechenden, das Peptid bzw. die Peptide codierende Phagen erforderlich. Die Charakterisierung umfasst bevorzugter Weise die Sequenzierung der an das jeweilige DNA-bindende Protein, insbesondere an das jeweilige HMG bindenden Peptide. Die Peptide sind dabei hinsichtlich Ihrer Länge grundsätzlich nicht beschränkt. Typischerweise werden in derartigen Verfahren jedoch Peptide mit einer Länge von 8 bis 20 Aminosäuren erhalten bzw. verwendet. Die Größe der Bibliotheken beträgt 10^2 bis 10^{18} , bevorzugter Weise 10^8 bis 10^{15} verschiedene Peptide.

Eine spezielle Form von an Zielmolekülen bindenden Polypeptiden stellen die Anticaline dar, wie sie beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung DE 197 42 706 beschrieben sind.

Weiterhin können auch kleine Moleküle verwendet werden, die die Wirkung der DNA-bindenden Proteine, insbesondere der HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäure antagonisieren. Derartige kleine Moleküle können beispielsweise durch ein Screeningverfahren, insbesondere ein Screening von Bibliotheken kleiner Moleküle identifiziert werden. Dabei wird das Zielmolekül mit einer Bibliothek in Kontakt gebracht und jene Mitglieder der Bibliothek, die daran binden, ermittelt, gegebenenfalls von den anderen Mitgliedern der Bibliothek bzw. vom Target abgetrennt und optional weiter charakterisiert. Auch hier wird die Charakterisierung des kleinen Moleküls nach den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannten Verfahrensweisen erfolgen, so z.B. die Verbindung identifiziert und die Molekularstruktur bestimmt werden. Diese Bibliotheken umfassen dabei so wenig wie zwei und soviel wie bis zu mehrere 100 000 Mitglieder. Aptamere, wie hierin verwendet, sind D-Nukleinsäuren, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig, die spezifisch an ein Zielmolekül binden. Die Herstellung von Aptameren ist bspw. beschrieben im Europäischen Patent EP 0 533 838. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Bei dem Verfahren zur Erzeugung der Aptameren wird eine Mischung aus Nukleinsäuren, d. h. potentiellen Aptameren bereitgestellt, wobei eine jede Nukleinsäure aus einem Segment aus wenigstens acht aufeinanderfolgenden, randomisierten Nukleotiden besteht und diese Mischung mit dem Target, im vorliegenden Falle somit mit DNA-bindenden Proteinen, insbesondere HMG-Proteinen, für sie codierenden Nukleinsäuren, Wechselwirkungspartnern von DNA-bindenden Proteinen, HMG-Wechselwirkungspartnern, insbesondere den natürlichen

Wechselwirkungspartnern und/oder für sie codierenden Nukleinsäuren in Kontakt gebracht wird, wobei Nukleinsäuren, die an das Target binden, ggf. auf der Grundlage einer erhöhten Affinität, verglichen mit der Kandidatenmischung, vom Rest der Kandidatenmischung abgetrennt werden und die solchermaßen erhaltenen an das Target, ggf. mit einer höheren Affinität oder Kraft, bindenden Nukleinsäuren amplifiziert werden. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt, so dass am Ende des Verfahrens spezifisch an das jeweilige Target oder Zielmolekül bindende Nukleinsäuren, sogenannte Aptamere, erhalten werden. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese Aptamere stabilisiert werden können, bspw. durch Einführung bestimmter chemischer Gruppen, wie den Fachleuten auf dem Gebiet der Aptamer-Entwicklung bekannt. Aptamere werden derzeit bereits therapeutisch eingesetzt. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die solchermaßen hergestellten Aptamere für die Targetvalidierung und als Leitsubstanzen für die Entwicklung von Medikamenten, insbesondere von kleinen Molekülen, verwendet werden.

Auf einem grundsätzlich ähnlichen Prinzip beruht die Herstellung oder Erzeugung von Spiegelmeren, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf der Grundlage der DNA-bindenden Proteine, insbesondere der HMG-Proteine, der für sie codierenden Nukleinsäuren, der Wechselwirkungspartnern von DNA-bindenden Proteinen, HMG-Wechselwirkungspartner, insbesondere der natürlichen Wechselwirkungspartner, und/oder der für sie codierenden Nukleinsäuren als Zielmolekül entwickelt werden können. Die Herstellung von Spiegelmeren ist bspw. beschrieben in der internationalen Patentanmeldung WO 98/08856. Spiegelmere sind L-Nukleinsäure, d.h. bestehen aus L-Nukleotiden, und zeichnen sich im wesentlichen dadurch aus, dass sie in biologischen Systemen eine sehr hohe Stabilität aufweisen und gleichzeitig, vergleichbar den Aptameren, mit einem Zielmolekül spezifisch wechselwirken bzw. an dieses binden können. Dabei wird genauer so vorgegangen, dass eine heterogene Population aus D-Nukleinsäuren erzeugt wird, die Population mit dem optischen Antipoden des Zielmoleküls in Kontakt wird, im vorliegenden Falle somit mit dem D-Enantiomer des natürlicher Weise auftretenden L-Enantiomers, sodann jene D-Nukleinsäuren abgetrennt werden, die nicht mit der optischen Antipode des Zielmoleküls in Wechselwirkung getreten sind, die D-Nukleinsäuren, die mit der optischen Antipode des Zielmoleküls in Wechselwirkung getreten sind, bestimmt, ggf. abgetrennt und sequenziert werden und anschließend L-Nukleinsäuren synthetisiert werden, die in ihrer Sequenz mit derjenigen zuvor für die D-Nukleinsäuren ermittelten Sequenzen identisch sind. Ähnlich dem Verfahren zur Herstellung von Aptameren ist es auch hier möglich, durch

mehrfaches Wiederholen der Schritte geeignete Nukleinsäuren, d.h. Spiegelmer anzureichern bzw. zu erzeugen.

Eine weitere Klasse von Verbindungen, die unter Verwendung der DNA-bindenden Proteine, insbesondere der HMG-Proteine und der dafür codierenden Nukleinsäuren hergestellt bzw. entwickelt werden können, sind Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide und RNAi.

All diesen Klassen ist dabei gemein, dass sie nicht auf der Ebene des Translationsproduktes, d.h. auf der Ebene der DNA-bindenden Proteine, insbesondere der HMG-Proteine und Wechselwirkungspartner davon, insbesondere HMGB1, ihre Wirkung entfalten, sondern auf der Ebene der für das jeweilige Protein codierenden Nukleinsäure, insbesondere der für HMGB1 codierenden mRNA.

Bei Ribozymen handelt es sich um katalytisch aktive Nukleinsäuren, die bevorzugter Weise aus RNA aufgebaut sind und aus zwei Teilbereichen bestehen. Der erste Teilbereich ist für eine katalytische Aktivität verantwortlich, wohingegen der zweite Teil für eine spezifische Wechselwirkung mit einer Ziel-Nukleinsäure verantwortlich ist. Kommt es zur Ausbildung einer Wechselwirkung zwischen der Ziel-Nukleinsäure und dem zweiten Teil des Ribozyms, typischer Weise durch Hybridisierung von zueinander im wesentlichen komplementären Basenbereichen, kann der katalytische Teil des Ribozyms entweder intramolekular oder intermolekular, wobei letzteres bevorzugt ist, die Ziel-Nukleinsäure hydrolysieren für den Fall, dass die katalytische Wirkung des Ribozyms eine Phosphodiesterase-Aktivität ist. In der Folge kommt es zu einem – ggf. weiteren – Abbau der codierenden Nukleinsäure, wobei der Titer des Zielmoleküls sowohl auf der Nukleinsäure- als auch der Proteinebene sowohl intrazellulär als auch extrazellulär verringert wird und somit eine therapeutischer Ansatz bei Erkrankungen des Endometriums bereitgestellt wird. Ribozyme, deren Verwendung sowie Konstruktionsprinzipien sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und bspw. beschrieben in Doherty und Doudna (Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:457-75) und Lewin und Hauswirth (Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 2001, 7:221-8).

Auf einem grundsätzlich ähnlichen Wirkmechanismus beruht die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden zur Herstellung eines Medikamentes bzw. diagnostischen Mittels. Antisense-

Oligonukleotide hybridisieren infolge Basenkomplementarität typischerweise mit einer Ziel-RNA, normaler Weise mit mRNA und aktivieren dadurch RNAaseH. RNAaseH wird sowohl durch Phosphodiester als auch Phosphorothioat-gekoppelte DNA aktiviert. Phosphodiester-gekoppelte DNA wird jedoch schnell durch zelluläre Nukleasen mit Ausnahme von Phosphorothioat-gekoppelter DNA abgebaut. Diese resistenten, nicht-natürlicher Weise auftretende DNA-Derivate inhibieren RNAaseH nicht, wenn sie mit RNA hybridisiert sind. Mit anderen Worten, Antisense-Polynukleotide sind nur als DNA-RNA-Hybridkomplex wirksam. Beispiele für derartige Antisense-Oligonukleotide finden sich, u.a. in US-Patent US 5,849,902 oder US 5,989,912. Prinzipiell besteht das wesentliche Konzept der Antisense-Oligonukleotide darin, gegen bestimmte RNA eine komplementäre Nukleinsäure bereitzustellen. Mit anderen Worten, ausgehend von der Kenntnis der Nukleinsäuresequenz der HMG-Proteine und ihrer Wechselwirkungspartner, insbesondere der jeweiligen mRNA, können durch Basenkomplementarität geeignete Antisense-Oligonukleotide hergestellt werden, die zu einem Abbau der codierenden Nukleinsäure, insbesondere der mRNA, führen.

Eine weitere Klasse von Verbindungen, die als Medikament bzw. diagnostisches Mittel grundsätzlich geeignet wären, ist die sogenannte RNAi. RNAi ist eine doppelsträngige RNA, die RNA-Interferenz vermittelt und typischerweise eine Länge von etwa 21 bis 23 Nukleotiden aufweist. Dabei entspricht einer der beiden Stränge der RNA einer Sequenz eines abzubauenen Genes. Mit anderen Worten, ausgehend von der Kenntnis der für die DNA-bindenden Proteine, insbesondere für die HMG-Proteine und/oder deren Wechselwirkungspartner codierenden Nukleinsäure, insbesondere der mRNA, kann eine doppelsträngige RNA hergestellt werden, wobei einer der beiden RNA-Stränge komplementär zu der besagten, für die DNA-bindenden Proteine, insbesondere für die HMG und/oder deren Wechselwirkungspartner codierenden Nukleinsäure ist, bevorzugter Weise zur mRNA, und diese dann zum Abbau der entsprechenden codierenden Nukleinsäure führt und damit einhergehend zu einer Verringerung des Titers der jeweiligen Proteine. Die Erzeugung und Verwendung von RNAi als Medikament bzw. diagnostisches Mittel ist bspw. beschrieben in den Internationalen Patentanmeldungen WO 00/44895 und WO 01/75164.

Mit Blick auf die Wirkmechanismen der vorstehend beschriebenen Klassen, Ribozymen, Antisense-Oligonukleotiden sowie RNAi, ist es somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, neben den DNA-bindenden Proteinen, insbesondere die HMG-Proteinen, insbesondere HMGB1,

und deren insbesondere natürlichen Wechselwirkungspartnern auch die dafür codierenden Nukleinsäuren, insbesondere die mRNA, zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung und/oder Prävention der vorstehend genannten Erkrankungen, nämlich Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis, bzw. für die Herstellung eines diagnostischen Mittels für die Diagnose der vorstehend genannten Erkrankungen und dem Überwachen des Verlaufes der Erkrankung bzw. der angesetzten Therapie, entweder direkt oder als Zielmolekül, zu verwenden.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die vorstehend genannten Klassen von Verbindungen, d. h. Antikörper, Peptide, Antikaline, kleine Moleküle, Aptamere, Spiegelmere, Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide sowie RNAi, die gegen die DNA-bindenden Proteine, insbesondere die HMG-Proteine, Fragmenten davon oder dafür codierenden Nukleinsäuren gerichtet sind und bevorzugterweise die Wirkung dieser Proteine bzw. der dafür codierenden Nukleinsäuren antagonisieren, für die Herstellung von Medikamenten zur Behandlung und/oder Prävention insbesondere von Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis verwendet werden. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese Medikamente bzw. Mittel nicht nur für die Behandlung der vorstehend genannten Erkrankungen, sondern auch für diagnostische Zwecke verwendet werden können, mithin die vorstehend genannte Mittel auch als Diagnostika oder diagnostische Mittel verwendet werden können, bevorzugterweise für Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis.

Die diese Mittel enthaltenden pharmazeutischen oder diagnostischen Zusammensetzungen umfassen in einer Ausführungsform neben einer oder mehreren der vorstehend genannten bzw., wie hierin offenbart, erzeugten Verbindungen noch andere pharmazeutisch oder diagnostisch wirksame Verbindungen oder Mittel, sowie bevorzugterweise zumindest einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. Derartige Träger können bspw. flüssig oder fest sein, bspw. eine Lösung, ein Puffer, eine alkoholische Lösung und dergleichen. Als geeignete feste Träger kommen bspw. Stärke und dergleichen in Betracht. Es ist den Fachleuten auf dem Gebiet der pharmazeutischen Darreichungsformen bekannt, wie die entsprechenden Verbindungen der verschiedenen Klassen formuliert werden müssen, um auf dem jeweils angestrebten Darreichungsweg, bspw. oral, parenteral, subcutan, intravenös und dergleichen mehr, verabreicht werden zu können.

Neben den vorstehend beschriebenen Mitteln, die DNA-bindende Proteine, insbesondere HMG-Proteine, Fragmente davon oder dafür codierende Nukleinsäuren antagonisieren, d. h. kleine Moleküle, Peptide, Anticaline, Antikörper, Aptamere, Spiegelmer, Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide (hierin auch als Antisense-Moleküle bezeichnet) sowie RNAi, kann auch der Zelloberflächenrezeptor RAGE oder Fragmente davon zu diesen Zwecken verwendet werden, d. h. als Mittel für die Herstellung eines diagnostischen Mittels für Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis oder eines Medikamentes für die Behandlung und/oder Prävention von Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis verwendet werden. Der Rezeptor, bzw. die davon abgeleiteten Fragmente, können, ohne im Folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, infolge bevorzugterweise kompetitiver Inhibierung die Wirkung der HMG-Proteine, insbesondere des HMGB1-Proteins antagonisieren. Daraus ergibt sich die erfindungsgemäße Verwendung des Zelloberflächenrezeptors RAGE bzw. seiner Fragmente bzw. der für ihn codierenden Nukleinsäuren zur Herstellung eines Medikamentes oder Diagnostikums für die Behandlung der vorstehend genannten Erkrankungen.

Dieser Wirkmechanismus beruht darauf, dass DNA-bindende Proteine, insbesondere HMG-Proteine, insbesondere HMGB1, extrazellulär ein Ligand des Zelloberflächenrezeptors RAGE ist (receptor for advanced glycation end products), der beispielsweise bei Taguchi et al. beschrieben ist (Taguchi, A., Blood, D.C., del Toro, G., Canet, A., Lee, D.C., Qu, W., Tanji, N., Lu, Y., Lalla, E., Fu, C., Hofmann, M.A., Kislinger, T., Ingram, M., Lu, A., Tanaka, H., Hori, O., Ogawa, S. Stern, D.M., Schmidt, A.M. (2000). Nature 405: 354-360).

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die HMG-Proteine, auch die hierin Bezug genommen wird, insbesondere jene sind, die hierin offenbart sind, jedoch sind sie nicht auf diese beschränkt. Weiterhin ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass der Begriff DNA-bindende Proteine synonym mit dem Begriff basische DNA-Proteine verwendet wird.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand der Figuren, Beispiele sowie des Sequenzprotokolls erläutert, aus denen sich weitere Merkmale, Ausgestaltungsformen und Vorteile ergeben. Dabei zeigt

Fig. 1 ein Diagramm mit Sprossenlängen aus Sphäroiden nach Behandlung mit VEGF oder HMGB1-Protein;

Fig. 2 ein Diagramm mit Sprossenlängen aus Sphäroiden nach Behandlung mit VEGF oder HMGA1-Protein;

Fig. 3 eine Erhöhung der Anzahl mitotisch aktiver Hautzellen unter dem Einfluss von HMGA1a;

Fig. 4 eine Immunfluoreszenzaufnahme von Hela-Zellen, die zum Teil fluoreszenzmarkiertes HMGA1b-Protein in den Zellkernen aufweisen;

Fig. 5 eine Immunfluoreszenzaufnahme von Fibroblasten, die zum Teil fluoreszenzmarkiertes HMGA1b-Protein in den Zellkernen aufweisen;

Fig. 6 eine Fluoreszenzaufnahme von Zellen, die reines Fluoreszein aufgenommen haben als Negativkontrolle zu den in Fig. 4 und 5 dargestellten Aufnahmen;

Fig. 7 eine lichtmikroskopische Aufnahme eines mit HMGA-Protein behandelten Hautstückchens, aus dem verschiedene Hautzelltypen wie Keratinocyten und Fibroblasten auswachsen; und

Fig. 8 eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Gefrierschnittes durch die Haut der Ratte zum Beleg des Transfers von markiertem HMGA1b-Protein nach Streptolysin O-Behandlung.

Beispiel 1: Material und Methoden

Die folgenden Materialien und Methoden wurden im Rahmen der weiteren Beispiele verwendet, sofern nicht im Einzelfall davon abweichend angegeben.

Der Transfer von Proteinen in eukaryotische Zellen mit Hilfe von Streptolysin O (SLO) erfolgt durch Variationen in der Ca^{2+} -Konzentration: in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen erfolgt die Lyse

der Zellen und durch nachfolgende Zugabe von Ca^{2+} -Ionen können die Zellen wieder verschlossen werden.

Kultivierung der Zellen

Als Vorbereitung werden die Zellen, insbesondere primäre humane Fibroblasten, primäre human Chondrozyten, primäre humane Keratinozyten, murine Keratinozyten (MSC-P5, Cell Lines Service and Cellbank, Heidelberg) und humane HeLa-Zellen (ECACC N 85060701) gleichmäßig auf 6-Well Platten mit je 2,5 ml Medium 199 (Gibco-BRL; mit 5 % fetalem Kälberserum) pro Well verteilt und über Nacht bis zu einer Zelldichte von ca. 50 - 70 % bei 37°C und 5 % CO_2 Begasung inkubiert. Als alternative Variation zum intakten Monolayer wird bei einigen Testreihen vor Versuchsbeginn in der Mitte der Wells mittels eines Zellschabers ein zellfreier Raum erzeugt, um eine künstliche Wunde zu simulieren.

Verfahren zum Einschleusen von HMGA1a in Monolayerzellkulturen mittels Streptolysin O

Vor der Lyse werden die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen, um Mediumrückstände, die Ca^{2+} -Ionen enthalten, zu entfernen. Die Lyse der Zellen durch Streptolysin O (Streptolysin O Reagent, Sigma-RBI) erfolgt in Ca^{2+} -freiem PBS-Puffer (Biochrom). Als optimale Streptolysin-Konzentration, bei der die Mehrzahl der Zellen reversibel verschließbare Poren erhalten, konnte in Vorversuchen mittels Trypan-Blau Färbung (Sigma-RBI) eine Konzentration von 0,1 U SLO/1 ml PBS für Fibroblasten ebenso wie für Keratinozyten der menschlichen Haut ermittelt werden. Pro Well werden 1 ml des PBS/Streptolysin-Gemisches mit der gewünschten Konzentration des auszutestenden HMG-Proteins (z. B. 100 ng/ml, 200 ng/ml und 1000 ng/ml HMGA1a) auf die Fibroblasten bzw. Epithelzellen bzw. Keratinozyten gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT erfolgt die Zugabe von 3 ml eiskaltem Medium 199 (mit 5 % fetalem Kälberserum und 1,8 mM Ca^{2+}), um die Zellen wieder zu verschließen. Die Zellen werden für 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 Begasung inkubiert. Anschließend werden die verschiedenen Ansätze durch 2,5 ml frisches Medium ersetzt und weiterhin bis zur Auswertung wie zuvor inkubiert.

Zur Auswertung werden die Zellen mikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie und der Besiedelung des zellfreien Raums beurteilt. Desweiteren erfolgt eine Methanol-Fixierung der

Zellen mit anschließender Giemsa-Färbung (2 %ige Giemsa-Lösung), um die Anzahl der Mitosen gegenüber der Gesamtzellzahl zu bestimmen.

Verfahren zur spontanen Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem HMGA-Proteinen in Monolayerzellkulturen

Vorbereitend wurden die Zellen in Leighton-Tubes mit eingelegten Deckgläsern (mit je 1 ml Medium 199 über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert).

Um sicherzustellen, daß keine Mediumreste mehr vorhanden sind, wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden 200 µl serumfreies Medium und je 6 µg markiertes HMGA-Protein bzw. als Negativkontrolle 6 µg Fluorescein-Lösung zu den Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 1 h lichtgeschützt bei 37 °C unter 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 250 µl Medium und eine weitere Inkubation von 2 h 30 min. Danach werden die Deckgläser in PBS kurz gewaschen und auf OT eingedeckt. Die Auswertung erfolgte nach ca. 4 h.

Verfahren zum Einschleusen von fluoreszenzmarkiertem HMGA1b in Monolayerzellkulturen mittels Streptolysin O

Vorbereitend wurden HeLa-Zellen und Fibroblasten in Leighton-Tubes mit je 1 ml Medium 199 o/n bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die HeLa-Zellen wurden in Medium mit 20 % fetalem Kälberserum, die Fibroblasten mit 5 %igem Kälberserum kultiviert.

Um sicherzustellen, daß keine Mediumreste mehr vorhanden sind, werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Das bei RT aufgetaute Streptolysin O wurde mit PBS auf eine Konzentration von 0,1 U/ml verdünnt. Anschließend wurden 350 µl des verdünnten Streptolysins O und 6 µg markiertes HMGA1b-Protein bzw. als Negativkontrolle 6 µg FLUOS-Lösung zu den HeLa-Zellen und den Fibroblasten gegeben. Der Ansatz wurde 15 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem Medium 199 (mit 20 % fetalem Kälberserum für die HeLa-Zellen und 5 %igem Kälberserum für die Fibroblasten) wurden die Zellen wieder verschlossen. Nach einer Inkubation von 1 h 30 min bei 37°C und 5 %

CO₂ werden die Deckgläschen in PBS kurz gewaschen und danach auf OT eingedeckt. Die Auswertung erfolgte nach ca. 2 h.

Verfahren zum Einschleusen von HMGA-Proteinen in Gewebestücke der Haut

Die Hautproben werden steril entnommen und für den Transport und bis zum Versuchsbeginn in Hanks-Lösung (Biochrom) gelagert. Für den Versuch wird die Haut in ca. 0,5 - 1 mm große Stücke geschnitten und auf Sarstedtröhrchen verteilt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 120×g und RT werden die Hautstücke dreimal in 1×PBS gewaschen, bis alle Mediumreste ausgewaschen sind. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird der Überstand vollständig entfernt und die Hautstückchen für 15 min bei RT in 1 ml SLO/PBS-Lösung (0,1 U SLO/1 ml PBS) und 1000 ng/ml des jeweiligen HMG-Proteins (HMGA1a, HMGA1b, HMGA2) pro Ansatz inkubiert. Zum Beenden der Lyse erfolgt die Zugabe von je 3 ml eiskaltem Medium 199 (mit 20 % fetalem Kälberserum und 1,8 mM Ca²⁺) und eine Inkubation der Ansätze für 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung. Abschließend werden die Hautstückchen auf sterile Deckgläschen verteilt, invertiert in Feuchtkammern überführt, mit je 5 ml 20 %igem Medium 199 bedeckt und weiterhin bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung inkubiert. Zur Auswertung werden die Hautstückchen täglich mikroskopiert und das Auswachsen der verschiedenen Hautzelltypen dokumentiert.

Verfahren zum Einschleusen von fluoreszenzmarkiertem HMGA1b in Gewebestücke der Haut

Die frisch entnommene Rattenhaut wurde in Medium 199 mit 20 %igem fetalem Kälberserum mittels sterilem Präparierbesteck in kleine Stücke, die einer Größe von ca. 1 - 2 mm² entsprachen, klein geschnitten. Die Hautstückchen wurden viermal mit PBS gewaschen, um so sämtliche Medium bzw. Ca²⁺-Rückstände zu beseitigen. Anschließend wurden die Hautstückchen in ein Eppendorfcup überführt und 350 µl des verdünnten Streptolysins O (0,1 U/ml) und 6 µg markiertes HMGA1b-Protein bzw. als Negativkontrolle 6 µg FLUOS-Lösung zu den Hautstücken gegeben. Der Ansatz wurde 15 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem Medium 199 (mit 20 % fetalem Kälberserum) wurden die Zellen wieder verschlossen. Nach einer Inkubation von 1 h 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ werden von den Hautstücken Gefrierschnitte angefertigt, die mit Antifade eingedeckt wurden.

Die Auswertung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop erfolgte nach ca. 2 - 3 h.

Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung von HMG-Proteinen

Die Markierung erfolgte nach dem Fluorescein Labeling Kit der Firma Roche.

Es wurden pro Ansatz 100 µg HMG-Protein, insbesondere HMGA1b Protein lyophilisiert und in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert. Zu dem gelösten HMGA1b wurden 1 µl FLUOS-Lösung (2 mg/ml) gegeben und der Ansatz wurde lichtgeschützt, unter Rühren 2 h bei RT inkubiert.

Sephadex-G-25-Säulen wurden mit 5 ml Blockierungslösung und 30 ml PBS äquilibriert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf die Säule übertragen und das markierte Protein mit 3,5 ml PBS eluiert. Das markierte Protein war jeweils in den ersten beiden Pools von jeweils 10 Tropfen (ca. 0,5 ml) enthalten.

Eine Verifizierung der Markierung erfolgte mittels HPLC (Vergleich der Peaks von FLUOS-Lösung/markiertes HMGA, insbesondere HMGA1b und PA-Gel. Dabei zeigte das markierte Protein bei UV-Licht eine deutliche Bande, was mittels Coomassie-Färbung bestätigt werden konnte. Es wurden ca. 60 µg/ml HMGA, insbesondere HMGA1b mit Fluorescein markiert.

Beispiel 2: Kultivierung von Endothelzellen

Methode:

Für die Kultivierung von humanen Endothelzellen wurden Arterienpräparate der Arteria carotis verwendet. Nach der Entnahme wurden die Gewebstücke bis zur Präparation in Hanks-Lösung gelagert. Die Präparation erfolgte in Hanks-Lösung, indem die Intima vorsichtig von der Media getrennt wurde. Anschließend wurden die ca. 1 mm großen Gewebstückchen auf Deckgläschen gelegt und umgekehrt in der Zellkulturflasche kultiviert. Die Vorkultivierung erfolgt in 1 ml endothelialem Wachstumsmedium mit den dazugehörigen Wachstumsfaktoren bei 37°C und 5 % CO₂. Nach dem Erreichen einer konfluenten Zelldichte wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und 1:3 geteilt.

Ergebnisse:

Nach ca. 2 Wochen konnten erste ausgewanderte Zellen beobachtet werden. Zur Verifizierung der Zellen wurde eine Immunhistochemie mit dem anti human CD 31 endothelial cell Antikörper durchgeführt. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich hierbei um humane Endothelzellen handelt.

Beispiel 3: Proliferationstest endothelialer Zellen durch die Applikation von HMGB1**Optimierung der Zellzahl****Methode:**

Der Proliferationstest wurde mit dem Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit der Firma Roche durchgeführt.

Zur Ermittlung der optimalen Zellzahl wurden verschiedene Verdünnungen der Endothelzellen ($10^5 - 10^2$ Zellen/100 μ l) in 96 well Platten für 2 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ in dem entsprechenden Wachstumsmedium kultiviert. Als Kontrolle diente das entsprechende Wachstumsmedium. Anschließend wurde pro Napf 10 μ l BrdU (Konzentration: 10 μ M) zugegeben und der Ansatz für 2h 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, erfolgte die Fixierung der Zellen mit 200 μ l/Napf Fixierungslösung durch eine Inkubation von 30 min bei RT. Danach wurden 100 μ l/Napf anti-BrdU-Antikörper zugegeben und 90 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers wurde der Ansatz dreimal mit 200 μ l Waschlösung gewaschen. Um die Proliferation mittels kolorimetrischer Bestimmung zu messen, wurde zu dem Ansatz 100 μ l/Napf Substrat gegeben, nach ca. 5 min mit 25 μ l/Napf 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption von 450 nm zu 750 nm mittels anthos readers 2001 gemessen. Es wurden pro Verdünnung drei Ansätze durchgeführt.

Ergebnisse:

Nach Berechnung des Mittelwertes der Parallelansätze wurden die verschiedenen Verdünnungen der Endothelzellen mittels Microsoft Excel graphisch dargestellt und ausgewertet. Dabei ergab sich eine optimale Zellzahl von 5.000-7.500 Zellen/100 µl.

Applikation von HMGB1 zu Endothelzellen**Methode:**

Die Kultivierung erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben. Nach Verteilung der optimalen Zellzahl der Endothelzellen in die entsprechenden Näpfe einer 96 Napf-Platte wurde der Ansatz für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von verschiedenen HMGB1-Konzentrationen (1 µg, 0,1 µg und 10 ng). Es wurden pro HMGB1-Konzentration 3 Parallelansätze durchgeführt. Nach einer Kultivierung von weiteren 24 h erfolgte die Zugabe von BrdU. Die weiteren Schritte wurden wie in Beispiel 3 unter „Optimierung der Zellzahl“ beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse:

Es konnte bei den Endothelzellen, denen HMGB1 appliziert wurde, eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Proliferationsrate und der applizierten HMGB1-Konzentration gezeigt werden. Allgemein konnte bei den Zellen, denen HMGB1 appliziert wurde, eine erhöhte Mitoserate makroskopisch festgestellt werden.

Beispiel 4: Untersuchungen zur proangiogenen Wirkung von HMGB1 im Sphäroidmodell**Methode:**

Vorbereitend wurden humane Endothelzellen mit dem entsprechenden endothelialen Wachstumsmedium bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die für die Versuche verwendeten Endothelzellen stammten aus der 2. bzw. 3. Passage. Nach der Kultivierung wurden die Zellen

trypsiniert und in dem entsprechenden Wachstumsmedium mit einem 20%igen Anteil Methocel resuspendiert. Nach einer Inkubation von ca. 4 h bildeten die Zellen spontane dreidimensionale Zellkugeln (Sphäroide), die dann in ein Kollagengel eingebettet wurden. Für den entsprechenden Wachstumstest wurden diesem Gel folgende HMGB1-Konzentrationen zugegeben: 2 µg/ml; 0,4 µg/ml und 0,08 µg/ml. Als Referenz diente der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF in einer Konzentration von 25 ng/ml bzw. wurde als Negativkontrolle kein Wachstumsfaktor zu dem Ansatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen wurden die Ansätze unter einem inversen Mikroskop mit einer Digitalkamera erfasst. Die Aufnahmen wurden direkt in die Bildanalyse-Software analySIS von Soft Imaging System eingelesen und ausgewertet.

Ergebnisse:

Mittels der Bildanalyse-Software konnte die additive Sprosslänge, d. h. die Gesamtlänge der von einem Sphäroid ausgehenden Sprossung ermittelt werden. Dabei konnte eine signifikante proangiogene Wirkung von HMGB1 bei einer Konzentration von 2 µg/ml ermittelt werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte hier ein deutliches Sprossen beobachtet werden. Des Weiteren zeigte die Kombination VEGF/HMGB1 ein stärkeres Aussprossen als nur HMGB1. Das Ergebnis ist graphisch in Fig. 1 dargestellt.

Beispiel 5: Untersuchungen zur proangiogenen Wirkung von HMGA1 im Sphäroidmodell

Methode:

Vorbereitend wurden humane Endothelzellen mit dem entsprechenden endothelialen Wachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die für die Versuche verwendeten Endothelzellen stammten aus der 2. bzw. 3. Passage. Nach der Kultivierung wurden die Zellen trypsiniert und in dem entsprechenden Wachstumsmedium mit einem 20%igen Anteil Methocel resuspendiert. Nach einer Inkubation von ca. 4 h bildeten die Zellen spontane dreidimensionale Zellkugeln (Sphäroide), die dann in ein Kollagengel eingebettet wurden. Für den entsprechenden Wachstumstest wurden diesem Gel eine HMGA1-Konzentration von 2 µg/ml zugegeben. Als Referenz diente der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF in einer Konzentration von 25 ng/ml bzw. wurde als Negativkontrolle kein Wachstumsfaktor zu dem Ansatz gegeben. Nach einer

Inkubationszeit von 2 Wochen wurden die Ansätze unter einem inversen Mikroskop mit einer Digitalkamera erfaßt. Die Aufnahmen wurden direkt in die Bildanalyse-Software analySIS von Soft Imaging System eingelesen und ausgewertet.

Ergebnisse:

Mittels der Bildanalyse-Software konnte die additive Sprossenlänge, d. h. die Gesamtlänge der von einem Sphäroid ausgehenden Sprossung ermittelt werden. Dabei konnte eine proangiogene Wirkung sowohl von HMGA1a als auch HMGA1b bei einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt werden. In der Kombination HMGA 1a konnte eine Steigerung des Aussprossens gezeigt werden im Vergleich zu VEGF ohne HMG-Protein. Die Ergebnisse sind graphisch in Fig. 2 dargestellt.

Beispiel 6: Transfer von HMGA1a-Proteinen in Fibroblasten-Monolayerkulturen der humanen Haut durch Streptolysin O

Im Vergleich zu den Hautzellen der Negativkontrolle (Behandlung nur mit Streptolysin O) konnte bei den mit den HMGA1a-Proteinen behandelten Zellen eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate festgestellt werden. Entsprechend der erhöhten Proliferationsrate konnte auch bei Auszählung der Anzahl der Zellen, die sich in der Mitose befinden, im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl ein signifikanter Anstieg in der Zellteilungsrate ermittelt werden. wie dies auch in Fig. 3 dargestellt ist. Darüber hinaus wiesen die mit HMGA-Proteinen behandelten Zellen eine erhöhte Motilität auf, was z. B. anhand des Einwuchses der Zellen in den zellfreien Raum ermittelt werden konnte.

Beispiel 7: Transfer von markierten HMGA1b-Proteinen in mit SLO behandelte Zellen

Die Aufnahme der markierten HMGA1b Proteine konnte nach einer Inkubationszeit von ca. 2 h sowohl in den Kernen der Hela-Zellen (Fig. 2) als auch in denen von Fibroblasten (Fig. 5) gezeigt werden. Die Betrachtung der Zellen unmittelbar nach der Behandlung mit SLO zeigte keine Positivität der Zellkerne, d. h. die Aufnahme der HMGA1b-Proteine in den Zellkern dauert

ca. 2 h. Es wurde beispielhaft für die Helazellen ein Verhältnis von HMGA1b-positiven Zellkernen im Vergleich zu HMGA1b-negativen von 16 zu 32 ermittelt.

Der Vergleich zur Negativkontrolle, d. h. die Aufnahme des reinen Fluoresceins, ergab keine Kernpositivität, sondern nur eine grünliche diffuse Färbung des Cytoplasmas, wie dies auch in Fig. 6 dargestellt ist.

Beispiel 8: Transfer von HMGA-Proteinen in Hautproben von Mensch und Ratte durch Streptolysin O

Bei dem Transfer der HMGA-Proteine (HMGA1a, HMGA1b und HMGA2) in die Zellen von Hautproben von Mensch und Ratte konnte eine erhöhte Proliferation bei den mit HMGA-Proteinen behandelten Hautstücken im Vergleich zu den Negativkontrollen ermittelt werden. Aus den analysierten Hautproben wuchsen verschiedene Hautzelltypen (z. B. Keratinozyten, Fibroblasten) aus (siehe Fig. 7), die trotz der Streptolysinbehandlung eine hohe Zellteilungsrate und Zellvitalität aufwiesen. Darüber hinaus war bei den mit HMGA-Proteinen behandelten Hautproben neben der erhöhten Proliferationsrate auch ein deutlicher Anstieg in der Motilität der Zellen zu verzeichnen; was die Übertragbarkeit des hierin offenbarten therapeutischen Konzeptes von Zellkulturen auf Gewebe bestätigt.

Beispiel 9: Transfer von markierten HMGA1b-Proteinen in die Haut der Ratte durch Streptolysin O

Die Auswertung der Gefrierschnitte ergab, wie Fig. 8 gezeigt, eine starke Kernpositivität bezüglich HMGA1 sowohl des Plattenepithels als auch teilweise des Bindegewebes. Auch hier zeigte sich, wie zuvor in der Zellkultur beobachtet, daß eine Kernpositivität erst nach einer Inkubationszeit von ca. 2 h beobachtet werden kann. Dies bestätigt wiederum, daß der Kerntransport der HMG-Proteine ca. 2 h beträgt.

Ein Vergleich zur Negativkontrolle zeigte eine grünliche diffuse Färbung des Cytoplasmas, wobei alle Zellkerne negativ gefärbt waren.

Beispiel 10: Fluoresceinmarkierung des HMGA1b-Proteins

Eine Verifizierung der Markierung erfolgte mittels HPLC (Vergleich der Peaks von FLUOS-Lösung/markiertes HMGA1b) und PA-Gel. Dabei zeigte das markierte Protein bei UV-Licht eine deutliche Bande, welches mittels Coomassie-Färbung bestätigt werden konnte. Es wurden ca. 60 µg/ml HMGA1b mit Fluorescein markiert.

Beispiel 11: Expressionsprofilanalyse mittels Mikroarrays zur Bestimmung der Wirkungsweise von HMGA1b-Proteinen auf die Geweberegeneration

Zur Analyse der molekulargenetischen Wirkungsweise der HMGA1b-Proteine bei der Geweberegeneration wurden Microarrays (Human 30K Array (A/B/C) von MWG-Biotech) eingesetzt, um das Expressionsmuster der mit HMGA1b-Proteinen behandelten Hautproben im Vergleich zu unbehandelten Hautproben zu analysieren.

Hierzu wurde eine humane Hautprobe in ca. 0,5 - 1 mm große Stücke geschnitten und auf Sarstedtröhrchen verteilt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 120×g und RT wurden die Hautstücke dreimal in 1×PBS gewaschen, bis alle Mediumreste ausgewaschen waren. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig entfernt und die Hautstückchen für 15 min bei RT in 1 ml SLO/PBS-Lösung (0,1 U SLO/1 ml PBS) und 1000 ng/ml des HMGA1b-Proteins pro Ansatz bzw. ohne Protein (Negativkontrolle) inkubiert. Zum Beenden der Lyse erfolgte die Zugabe von je 3 ml eiskaltem Medium 199 (mit 20 % fetalem Kälberserum und 1,8 mM Ca^{2+}) und eine Inkubation der Ansätze für 12 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 Begasung.

Die Isolierung der RNA aus den Hautproben erfolgte über das RNeasy RNA Isolierungs Kit (Qiagen) nach dem Protokoll „Isolation of total RNA from Heart, Muscle, and Skin Tissue“ des Herstellers und einem zusätzlichen DNase Verdau für 2×15 min bei 25°C. Die Synthese der ss cDNA wurde nach dem Standardprotokoll für Superscript (Invitrogen) durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierung der cDNA erfolgte mit Cy3-UTP und Cy5-UTP über „Direct-labeling“ der ss cDNA.

Zur Hybridisierung wurde die markierte cDNA für 3 min bei 95°C denaturiert, 3 min auf Eis inkubiert und ggf. ausfallende Präzipitate bei 42°C gelöst. Die Hybridisierung erfolgte nach Angaben des Microarray Herstellers (MWG Biotech) mit Hilfe eines Microarray Gene Frames bei 42°C für 16 - 24 Stunden. Die anschließenden Waschschrte in 2×SSC, 0,1 % SDS (Waschpuffer1), 1×SSC (Waschpuffer2) und 0,5×SSC (Waschpuffer3) erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung wurde mit einem Affymetrix 428 Array Scanner durchgeführt.

Über die Analyse der erhaltenen Expressionsmuster konnten wichtige Informationen über die Wirkungsweise der HMGA-Proteine bzw. des HMGA1b-Proteins bei der Proliferation und Reaktivierung von Haut-Zellen gewonnen werden. Das Ergebnis der Auswertung zeigte die Wirkung der Zugabe des HMGA1b-Proteins auf die Genexpression des Zielgewebes über die Interaktion des HMGA1b-Proteins mit seinen Partnern auf Protein-DNA sowie Protein-Protein Ebene. Über diese Mechanismen der Interaktionen des Proteins wird das Expressionsmuster einer Reihe von Genen, die an der Wundheilung sowie der Regeneration der Haut beteiligt sind, reguliert. Über den Nachweis der Re-Expression fetaler Genen in adultem Gewebe konnte die bedeutende Rolle der HMGA-Proteine bzw. des HMGA1b-Proteins bei der Geweberegeneration der Haut sowohl auf dem Gebiet der Wundheilung als auch für das Anti-Aging, d. h. für die Gewebeverjüngung verifiziert werden.

Beispiel 12: Expressionsprofilanalyse mittels Mikroarrays zur Bestimmung der Wirkungsweise von HMGA-Proteinen auf die Reparatur von DNA-Schäden

Zur Analyse der molekulargenetischen Wirkungsweise der HMGA-Proteine bei der Reparatur von DNA-Schäden wurden Arrays (Atlas-Arrays 1.2 von Clontech, # 7850-1, 1176 Gensequenzen des menschlichen Genoms umfassend) eingesetzt, um das Expressionsmuster der mit HMGA-Proteinen behandelten Keratinozyten im Vergleich zu unbehandelten Keratinozyten zu analysieren.

Die Isolierung der RNA aus den Zellen erfolgte über das RNeasy RNA Isolierungs Kit (Qiagen) nach dem Protokoll „Isolation of total RNA from Heart, Muscle, and Skin Tissue“ des Herstellers und einem zusätzlichen Dnase Verdau für 2×15 min bei 25°C. Die Synthese der ss

cDNA wurde nach dem Standardprotokoll für Superscript (Invitrogen) durchgeführt, die cDNA radioaktiv (^{32}P) markiert und dann zur Hybridisierung eingesetzt.

Eingesetzt wurden die Proteine HMGA1a, HMGA1b und HMGA2 in einer Menge von jeweils 6 μg . Es zeigte sich, daß durch die Gabe von rekombinanten, humanen HMGA-Proteinen Gene heraufreguliert wurden, deren Proteine in Zusammenhang mit der Reparatur von DNA-Schäden stehen. Beispiele zeigt die Tab.3. ATM ist eine Proteinkinase, die bei Doppelstrangbrüchen aktiviert wird. ATM phosphoryliert weitere Schlüsselproteine als Antwort auf Doppelstrangbrüche (Yosef Shiloh: ATM and related proteins kinases: safeguarding genome integrity. Nature Review Cancer 2003: 3, 155-168.). TOP1 ist Topoisomerase 1, die in DNA-Reparaturprozesse involviert ist (Pastor N, Cortes F: DNA topoisomerase activities in Chinese hamster radiosensitive mutants after X-ray treatment. Cell Biol Int 2002: 26, 547-555.)

Tab. 3: Heraufregulation von Genen, deren Proteine in Zusammenhang mit der Reparatur von DNA-Schäden stehen, als Folge der Gabe von HMGA-Proteinen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert (Dreifach-Ansätze) des Quotienten aus der Expression im behandelten Ansatz durch die Expression im unbehandelten Ansatz.

HMGA-Protein	HMGA1a	HMGA1b	HMGA2
Gen			
ATM	1,43	2,16	2,25
TOP1	4,37	3,89	4,53

Beispiel 13: Spontaner Transfer von Fluoreszenz-markierten HMGA1b und HMGA2-Proteinen in menschliche Epithelzellen

Die spontane Aufnahme der markierten HMGA Proteine, insbesondere HMGA1b und HMGA2 konnte nach einer Inkubationszeit von ca. 4 h in den Kernen der Zellen gezeigt werden. Die Betrachtung der Zellen unmittelbar nach der Behandlung zeigte keine Positivität der Zellkerne, d. h. die Aufnahme der HMGA-Proteine in den Zellkern dauert ca. 4 h.

Der Vergleich zur Negativkontrolle, d. h. die Aufnahme des reinen Fluoresceins, ergab keine Kernpositivität, sondern nur eine grünliche diffuse Färbung des Cytoplasmas. Abhängig von dem einzelnen Experiment, wie in Beispiel 1 allgemein beschreiben, zeigen 50-100 % der Zellen die nukleäre Fluoreszenzfärbung. Da diese Färbung erst bei relativ hohen Proteinkonzentration sichtbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass alle Zellen HMGA-Proteine aufnehmen.

Über die Analyse der erhaltenen Expressionsmuster konnten wichtige Informationen über die Wirkungsweise der HMGA-Proteine bzw. des HMGA1b-Proteins bei der Proliferation und Reaktivierung von Haut-Zellen gewonnen werden. Das Ergebnis der Auswertung zeigte die Wirkung der Zugabe des HMGA1b-Proteins auf die Genexpression des Zielgewebes über die Interaktion des HMGA1b-Proteins mit seinen Partnern auf Protein-DNA sowie Protein-Protein Ebene. Über diese Mechanismen der Interaktionen des Proteins wird das Expressionsmuster einer Reihe von Genen, die an der Wundheilung sowie der Regeneration der Haut beteiligt sind, reguliert. Über den Nachweis der Re-Expression fetaler Genen in adultem Gewebe konnte die bedeutende Rolle der HMGA-Proteine bzw. des HMGA1b-Proteins bei der Geweberegeneration der Haut sowohl auf dem Gebiet der Wundheilung als auch für das Anti-Aging, d. h. für die Gewebeverjüngung verifiziert werden.

Beispiel 14: Immunhistochemie mit einem gegen das HMGB1 gerichteten Antikörper

Alle immunhistochemischen Untersuchungen an Paraffinschnitten (5µm) von menschlichen menschlichen Geweben und Gewebeproben des Hundes wurden mit einem polyklonalen Antikörper (sc-12523, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) aus der Ziege durchgeführt, der gegen ein Peptid aus einer internen Region des menschlichen HMGB1-Proteins gerichtet ist. Der verwendete Antikörper detektiert das HMGB1- und in schwächerem Maße das HMGB2-Protein.

Beispiel 15: Immunhistochemischer Nachweis von HMGB1-Protein an von Psoriasis betroffenen Hautarealen und Vergleich mit nicht-betroffenen Arealen der Patienten

Das überraschende Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung an von Psoriasis betroffenen Hautarealen und Vergleich mit nicht-betroffenen Arealen der Patienten (drei Gewebepaare) besteht darin, dass das HMGB1-Protein in den Kapillaren der Blutgefäße der betroffenen Areale wesentlich stärker exprimiert wird als in den Kontrollgeweben. Positivität fand sich dabei überwiegend im Zytoplasma der betroffenen Endothelzellen und hier wiederum besonders stark in solchen Bereichen der Kapillaren, bei denen eine Proliferationsaktivität bei der Psoriasis stattfindet. Bei 2/3 Gewebepaare vorhandene Monozyten in den Psoriasis-Arealen färbten sich ebenfalls stark zytoplasmatisch positiv.

Infolgedessen ist die Verwendung von Inhibitoren zum HMGB1-Protein, wie sie hierin offenbart sind, ein geeignetes Mittel zur Behandlung dieser Erkrankung.

Beispiel 16: Immunhistochemischer Nachweis von HMGB1-Protein bei der malignen Histiozytose des Hundes

Die maligne Histiozytose ist eine relativ seltene Erkrankung des Hundes mit extrem schlechter Prognose. Eine Häufung wird beim Berner Sennenhund beobachtet. Die Erkrankung ist u.a. charakterisiert durch die Proliferation von Makrophagen. Untersucht wurden hier Gewebeproben von fünf Hunden. Eine starke Immunreaktion der Makrophagen fand sich bei allen untersuchten Proben und war deutlich stärker als bei Kontrollgewebe. Das Protein fand sich vorwiegend im Zytoplasma der Makrophagen.

Infolgedessen ist die Verwendung von Inhibitoren zum HMGB1-Protein, wie sie hierin offenbart sind, ein geeignetes Mittel zur Behandlung dieser Erkrankung.

Beispiel 17: Immunhistochemischer Nachweis von HMGB1-Protein bei der chronischen superfizialen Keratitis der Hunde-Cornea

Bei der chronischen superfizialen Keratitis der Hunde-Cornea handelt es sich um eine Gewebeveränderung, bei der inflammatorische Vorgänge und die Neoangiogenese eine Rolle spielen. Als Folge der Erkrankung kann es zu einer Erblindung der betroffenen Tiere kommen. Es wurden zytologische Präparate von erkrankten Tieren angefertigt und immunhistochemisch ausgewertet. Dabei fand sich eine deutliche Positivität der Lymphozyten für HMGB1.

Infolgedessen ist die Verwendung von Inhibitoren zum HMGB1-Protein, wie sie hierin offenbart sind, ein geeignetes Mittel zur Behandlung dieser Erkrankung.

Beispiel 18: Regulation von VEGF1 in Endothelzellen durch HMGB1

Die Präparation und Kultur menschlicher Endothelzellen erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben. Nach Zugabe von menschlichem rekombinanten HMGB1 (rHMGB1) in den folgenden Konzentrationen: 80ng/ml, 200ng/ml und 400ng/ml, erfolgte 10 Stunden nach Zugabe die Ernte der Zellen und RNA-Isolierung (zur RNA-Präparation, Northern-Blot Hybridisierung s. Flohr et al., Anticancer Res. 2001; 21: 3881-3886). Die Quantifizierung erfolgte mittels Northern-Blot-Analyse unter Verwendung einer cDNA Sequenz des open reading frame des menschlichen VEGF A. Gegenüber der Kontrolle, die kein Protein enthält, kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der VEGF A Expression um die Faktoren 1,6, 2,8 und 3,2 (Durchschnittswerte von Doppelbestimmungen).

Infolgedessen ist die Verwendung von Inhibitoren zum HMGB1-Protein, wie sie hierin offenbart sind, ein geeignetes Mittel zur Verringerung der durch VEGF A vermittelten Angiogenese und damit ein probates Mittel zur Behandlung von Tumoren. Umgekehrt kann HMGB1 bzw. eine dafür codierende Nukleinsäure als Effektor für eine gesteigerte Expression von VEGF A und damit als Mittel für die Behandlung von Erkrankungen verwendet werden, bei denen VEGF A gegeben wird.

Beispiel 18: Proliferation und Migration von Keratinocyten durch HMGB1

Die Präparation und Kultur menschlicher Hautexplantate in vitro erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben. Es wurden je vier Parallelkulturen von zwei Spender angelegt. Fünf Explantate pro Kulturansatz. Die Zugabe von menschlichem rekombinanten HMGB1 (rHMGB1) erfolgte in einer Konzentration von 200ng/ml. Die mikroskopische Bestimmung der Zellzahl erfolgte 8 Tage nach Kulturansatz durch Zählung der aus den Explantaten ausgewanderten Keratinozyten (morphologische Differenzierung Keratinozyten vs. Fibroblasten). Gegenüber der Kontrolle eine durchschnittliche Erhöhung der Anzahl der Keratinozyten um 28%.

Das Beispiel belegt die Eignung von HMGB1 zur Proliferation und Migration von Keratinozyten.

Die in der vorangehenden Beschreibung, den Ansprüchen, den Zeichnungen sowie dem Sequenzprotokoll, das Teil der Beschreibung sein soll, offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination zur Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Verwendung, insbesondere in vitro, einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung, Wundheilung, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure(n) eine solche ist, die für HMGB1 oder einen Teil davon codiert.

2. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die mit mangelnder oder übermäßiger Angiogenese oder Neovaskularisierung oder mit Wundheilung im Zusammenhang steht oder transmyokardiale Revaskularisierung erforderlich macht,

wobei die Nukleinsäure eine solche ist, die für HMGB1 oder einen Teil davon codiert.

3. Verwendung, insbesondere in vitro, einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung, Wundheilung, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group Protein umfasst.

4. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die mit mangelnder oder übermäßiger Angiogenese oder Neovaskularisierung oder mit Wundheilung im Zusammenhang steht oder transmyokardiale Revaskularisierung erforderlich macht,

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group Protein umfasst.

5. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Krankheit, insbesondere nach Anspruch 2 und/oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die diabetische Retinopathie, proliferative Retinopathia diabetica, diabetische Nephropathie, Makuladegeneration, Arthritis, Endometriose, Pannus, Histiozytosen, Psoriasis, Rosacea, Besenreiservarizen, eruptives Hämangiom, Tumorerkrankungen, kavernöses Hämangiom, Lippenangiom, Hämangiosarkom, Hämorrhoiden, Arteriosklerose, Angina pectoris, Ischämie, Infarkt, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanom, Kaposi-Sarkom, Tumore, Gestose, Unfruchtbarkeit, akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden, OP-Wunden und chronische Wunden umfasst.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die chronische Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Decubitus, Ulcus cruris, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetischen Ulcus, Decubitalulcus, chronische posttraumatische Wunde und diabetischer Fuß umfasst.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die die HMGA-Familie, die HMGB-Familie und die HMGN-Familie umfasst.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist.

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGB1, HMGB2 und HMGB3 umfasst.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein HMGB1 ist.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein aus der HMGA-Familie ausgewählt ist.

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c und HMGA2 umfasst.

13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein HMGA1a ist.

14. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein High Mobility Group Protein aus der HMGA-Familie ausgewählt ist, und ein zweites High Mobility Group Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist, wobei das Protein aus der HMGBA-Familie bevorzugterweise HMGA1a und das Protein aus der HMGB-Familie bevorzugterweise HMGB1 ist.

15. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich VEGF oder eine dafür codierende Nukleinsäure verwendet wird.

16. Verfahren zur Beeinflussung der Angiogenese oder Neovaskularisierung oder der Wundheilung von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,

b) Zugabe einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) und

c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en),

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, und optional

d) Erhalten oder Wiedergewinnen des Gewebes oder einer Zwischenstufe davon.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewebe oder ein Teil davon mit VEGF und/oder einer dafür codierenden Nukleinsäure inkubiert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass es ein *in vitro*-Verfahren ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewebe explantiertes Gewebe oder *in vitro* gezüchtetes Gewebe ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehrere der HMGB-Proteine oder der dafür codierenden Nukleinsäuren verwendet werden, wobei bevorzugterweise ein High Mobility Group-Protein aus der HMGBA-Familie ausgewählt ist, und ein zweites High Mobility Group-Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist, wobei das Protein aus der HMGBA-Familie bevorzugterweise HMGA1a und das Protein aus der HMGB-Familie bevorzugterweise HMGB1 ist.

22. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu der/den Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en), wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt oder Translationsprodukt verwendet wird, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für Vascular Endothelial Growth Factor umfasst

23. Pharmazeutische Formulierung umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und einen pharmazeutisch geeigneten Träger.

24. Trägermaterial umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

25. Trägermaterial nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial aus einem Material besteht, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Zellulose, Agarose, Kollagen, Silikon, Silicium, Kunststoffe, Gele, Hydrogele, Matrices basierend auf Fibrin, Kustseidenfasern, Hydrokolloide, Lipokolloide, Polyurethan, Polyurethanharz, Gips, synthetische Biomaterialien, thermoplastische Kunststoffe, Zinkleim, Polsterschaum, Polyisobutylen, Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika und Feuchthaltemittel umfasst.

26. Trägermaterial nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial als Implantat oder zur Wundheilung dient.

27. Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial und eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

28. Wundabdeckungsmaterial nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Deckmaterial aus der Gruppe ausgewählt ist, die Hydrokolloid-Verbände, Calciumalginat-Verbände, Aktivkohlekompressen/auflagen, Schaumstoffwundauflagen, Folienverbände, Transparentverbände, Silikonschaumverbände, Vliesstoffwundauflagen, Hydrozelluläre Wundverbände, Hydroselektive Wundauflagen, Absorbierende Wundkissen, Sprühverbände, Kunstseidengaze, Baumwollgaze, Paraffingazeverbände, silberbeschichtete Wundverbände und Hydropolymer-/Schaumverbände umfasst.

29. Formulierung umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und eine Trägerphase, wobei die Trägerphase bevorzugterweise aus der Gruppe ausgewählt ist, die Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in

Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogele, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays umfasst.

30. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem verursachten Reaktion.

31. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung;
- c) Testen der Referenzverbindung im Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung;
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion; und

f) Vergleich der Reaktion von der Referenz-Verbindung im Testsystem mit der Reaktion von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem.

32. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Vaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung, wobei die Referenz-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen der Kandidaten-Verbindung; und
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Referenz-Verbindung bestimmt wird.

33. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Vaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung, wobei die Kandidaten-Verbindung eine Markierung trägt;

c) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;

d) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung; und

e) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Testsystem ein *in vitro* Testsystem oder ein *in vivo* Testsystem ist.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Förderung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Förderung des Prozesses ist, wenn die Reaktion der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem gleich oder stärker ist als die Reaktion der Referenz-Verbindung.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Inhibierung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zum Inhibieren des Prozesses ist, wenn die von der Kandidaten-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems eine geringere Reaktion ist als die von der Referenz-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenz-Verbindung eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) umfasst, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, insbesondere wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 36, wobei der Prozess die Inhibierung der Angiogenese ist.

39. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 30 bis 38 zum Screenen einer Verbindung zur Behandlung und/oder Prävention einer Erkrankung, wobei das bereitgestellte Testsystem ein Testsystem für die jeweilige Krankheit ist.

40. Verwendung nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die solche Krankheiten umfasst, die Förderung oder Inhibierung von Angiogenese oder Neovaskularisierung erforderlich machen oder transmyokardiale Revaskularisierung oder Wundheilung erforderlich machen.

41. Verwendung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die diabetische Retinopathie, proliferative Retinopathia diabetica, diabetische Nephropathie, Makuladegeneration, Arthritis, Psoriasis, Rosacea, Besenreiservarizen, eruptives Hämangiom, kavernöses Hämangiom, Lippenangiom, Hämangiosarkom, Hämorrhoiden, Artherosklerose, Angina pectoris, Ischämie, Infarkt, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanom, Kaposi-Sarkom, Tumore, Gestose, Unfruchtbarkeit, akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden, OP-Wunden und chronische Wunden umfasst.

42. Verwendung nach einem der Ansprüche 39 bis 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkrankung eine Tumorerkrankung ist, wobei bevorzugterweise die Tumorerkrankung nekrotische Zellen, bevorzugterweise nekrotische Tumorzellen aufweist.

43. Verbindung erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 30 bis 38.

44. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 43 zur Herstellung eines Medikamentes, bevorzugterweise zur Behandlung und/oder Prävention einer Krankheit, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

45. Verwendung, insbesondere in vitro, einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der

Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

46. Verwendung, insbesondere in vitro, einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Entdifferenzierung von Zellen und Reprogrammierung von Zellen umfasst, für Gewebeaufbau und/oder Geweberegeneration, insbesondere beruhend auf der Grundlage einer Entdifferenzierung und/oder Differenzierung des aufzubauenden oder zu regenerierenden Gewebes,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

47. Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die Krankheiten, die die Reparatur von DNA-Schäden erforderlich machen, Krankheiten, die die Geweberegeneration erforderlich machen, Krankheiten, die die Wundheilung erforderlich machen, die mit Gewebealterung einhergeht, Krankheiten, die Zahn- und Knochenimplantate erforderlich machen, Krankheiten, die mit Gewebealterung einhergehen, Wundheilungsstörung, Hauterkrankungen, Xeroderma pigmentosum, Lederhaut, Hautkrebs, Hautkrebs nach Sonnenbrand, Hautalterung nach Sonnenbrand, Sonnenbrand und Herzinfarkt umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

48. Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt zur Herstellung eines kosmetischen Produktes, bevorzugterweise eines

kosmetischen Produktes für die Geweberegeneration, Wundheilung, Prävention von Lederhaut, Prävention von Hautkrebs, insbesondere Hautkrebs nach Sonnenbrand, Hautalterung, insbesondere Hautalterung nach Sonnenbrand, Gewebeerhaltungsverhinderung und/oder Gewebeerjüngung,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-Protein umfasst.

49. Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für die Herstellung eines Medikamentes Prävention und/oder Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die Hauterkrankungen, Xeroderma pigmentosum, Lederhaut, Hautkrebs, Hautkrebs nach Sonnenbrand, Sonnenbrand, akute Wunden und chronische Wunden umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

50. Verwendung nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass die akute Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden und OP-Wunden umfasst.

51. Verwendung nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass die chronische Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Decubitus, Ulcus cruris, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetische Ulcus, Decubitalulcus, chronische posttraumatische Wunde und diabetischer Fuß umfasst.

52. Verwendung nach einem der Ansprüche 45 bis 51, dadurch gekennzeichnet, dass das basische DNA-bindende Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die High Mobility Group-Proteine umfasst.

53. Verwendung nach einem der Ansprüche 45 bis 52, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA, HMGB und HMGN umfasst.

54. Verwendung nach einem der Ansprüche 45 bis 53, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ein Protein der HMGA-Familie ist.

55. Verwendung nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA1a, HMGA1b und HMGA2 umfasst.

56. Verwendung nach einem der Ansprüche 45 bis 55, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuren, die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO. 31 bis SEQ ID NO. 64 und deren jeweiligen Derivate umfasst.

57. Verwendung nach einem der Ansprüche 45 bis 56, dadurch gekennzeichnet, dass das Translationsprodukt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Polypeptide mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 30 und deren jeweilige Derivate umfasst.

58. Verwendung nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein eine Modifikation aufweist, wobei die Modifikation aus der Gruppe ausgewählt ist, die Phosphorylierung und Acetylierung umfasst.

59. Verfahren zur Regeneration von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt und
- c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst, und optional

d) Erhalten oder Wiedergewinnen des regenerierten Gewebes oder einer Zwischenstufe davon.

60. Verfahren nach Anspruch 59, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren ein in vitro-Verfahren ist.

61. Verfahren nach Anspruch 59 oder 60, dadurch gekennzeichnet, dass das zu regenerierende Gewebe verschieden oder identisch ist von dem in Schritt a) bereitgestellten Gewebe.

62. Verfahren nach einem der Ansprüche 59 bis 61, dadurch gekennzeichnet, dass das zu regenerierende Gewebe und/oder das in Schritt a) bereitgestellte Gewebe unabhängig voneinander ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Hautgewebe, Fettgewebe, Knorpelgewebe, Muskelgewebe, Zellen des Blutes und des Blutbildes und Nervenzellen umfasst.

63. Verfahren nach einem der Ansprüche 59 bis 62, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

64. Verfahren zur Entdifferenzierung und/oder Reprogrammierung von Zellen umfassend die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen einer oder mehrerer Zellen,

b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, und

c) Inkubieren der Zelle und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

65. Verfahren nach Anspruch 64, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren ein in vitro-Verfahren ist.

66. Verfahren nach Anspruch 64 oder 65, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren weiterhin den Schritt umfasst:

d) Erhalten einer entdifferenzierten und/oder reprogrammierten Zelle.

67. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 bis 66, dadurch gekennzeichnet, dass die entdifferenzierte Zelle(n) und/oder reprogrammierte Zelle(n) und/oder die gemäß Schritt a) bereitgestellte(n) Zelle(n) unabhängig voneinander ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Zellen der Epidermis, Zellen der Haut, Zellen des Fettgewebes, Zellen des Knorpelgewebes, Zellen des Muskelgewebes, Zellen des Blutes, Zellen des blutbildenden Gewebes und Nervenzellen umfasst.

68. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 bis 67, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

69. Pharmazeutische Formulierung umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und einen pharmazeutisch geeigneten Träger.

70. Trägermaterial umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

71. Trägermaterial nach Anspruch 70, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial aus einem Material besteht, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Zellulose, Agarose, Kollagen, Silikon, Silicium, Kunststoffe, Gele, Hydrogele, Matrices basierend auf Fibrin, Kustseidenfasern, Hydrokolloide, Lipokolloide, Polyurethan, Polyurethanharz, Gips,

synthetische Biomaterialien, thermoplastische Kunststoffe, Zinkleim, Polsterschaum, Polyisobutylen, Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika und Feuchthaltemittel umfasst.

72. Trägermaterial nach Anspruch 70 oder 71, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial als Implantat oder zur Wundheilung dient.

73. Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial und eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

74. Wundabdeckungsmaterial nach Anspruch 73, dadurch gekennzeichnet, dass das Deckmaterial aus der Gruppe ausgewählt ist, die Hydrokolloid-Verbände, Calciumalginat-Verbände, Aktivkohlekompressen/auflagen, Schaumstoffwundauflagen, Folienverbände, Transparentverbände, Silikonschaumverbände, Vliesstoffwundauflagen, hydrozelluläre Wundverbände, Hydroselektive Wundauflagen, absorbierende Wundkissen, Sprühverbände, Kunstseidengaze, Baumwollgaze, Paraffingazeverbände, silberbeschichtete Wundverbände und Hydropolymer-/Schaumverbände umfasst.

75. Kosmetische Formulierung umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und eine Trägerphase, wobei die Trägerphase bevorzugterweise aus der Gruppe ausgewählt ist, die Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogele, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays umfasst.

76. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei

Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem verursachten Reaktion.

77. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung;
- c) Testen der Referenzverbindung im Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung;
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion; und
- f) Vergleich der Reaktion von der Referenz-Verbindung im Testsystem mit der Reaktion von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem.

78. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebeatmung, Verhinderung der Gewebeatmung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung, wobei die Referenz-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen der Kandidaten-Verbindung; und
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Referenz-Verbindung bestimmt wird.

79. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Reparatur von DNA-Schäden, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebeatmung, Verhinderung der Gewebeatmung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung, wobei die Kandidaten-Verbindung eine Markierung trägt;

c) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;

d) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung; und

e) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird.

80. Verfahren nach einem der Ansprüche 76 bis 79, dadurch gekennzeichnet, dass das Testsystem ein *in vitro* Testsystem oder ein *in vivo* Testsystem ist.

81. Verfahren nach einem der Ansprüche 76 bis 80, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Förderung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Förderung des Prozesses ist, wenn die Reaktion der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem gleich oder stärker ist als die Reaktion der Referenz-Verbindung.

82. Verfahren nach einem der Ansprüche 76 bis 80, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Inhibierung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zum Inhibieren des Prozesses ist, wenn die von der Kandidaten-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems eine geringere Reaktion ist als die von der Referenz-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems.

83. Verfahren nach einem der Ansprüche 76 bis 80, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenz-Verbindung eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt ist, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindenden Proteine umfasst, insbesondere wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

84. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 76 bis 83 zum Screenen einer Verbindung zur Behandlung und/oder Prävention einer Erkrankung, wobei das bereitgestellte Testsystem ein Testsystem für die jeweilige Krankheit ist.

85. Verwendung nach Anspruch 84, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die die Reparatur von DNA-Schäden erforderlich macht, die Geweberegeneration erforderlich macht, die Wundheilung erforderlich macht, die Zahn- und Knochenimplantate erforderlich macht, die mit Gewebeerkrankung einhergeht, Wundheilungsstörung, Hauterkrankungen, Xeroderma pigmentosum, Lederhaut, Hautkrebs, Hautkrebs nach Sonnenbrand, Hautalterung nach Sonnenbrand, Sonnenbrand und Herzinfarkt umfasst.

86. Sonnenschutzmittel umfassend zumindest eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-Proteine umfasst.

87. Sonnenschutzmittel nach Anspruch 86, dadurch gekennzeichnet, dass die basischen DNA-Proteine HMG-Proteine, insbesondere solche sind, die in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben sind.

89. Verbindung erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 76 bis 83 oder einer Verwendung nach Anspruch 84 oder 85.

90. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 89 zur Herstellung eines Medikamentes, bevorzugterweise zur Behandlung und/oder Prävention einer Krankheit, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

91. Verfahren zur Behandlung eines Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass dem Organismus eine wirksame Menge eines DNA-bindenden Proteins, eines HMG-Proteins, einer dafür codierenden Nukleinsäure oder eines Transkriptionsproduktes und/oder eines Translationsproduktes, einer damit wechselwirkenden funktionalen Nukleinsäure, eines damit wechselwirkenden Peptides oder Antikörpers und/oder einer Verbindung nach Anspruch 89 verabreicht wird.

92. Verfahren nach Anspruch 91, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus an einer Krankheit leidet oder die Möglichkeit besteht an dieser Krankheit zu leiden oder zu erkranken und die Krankheit bevorzugterweise eine solche ist, wie sie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben ist.

HMGB1-Konzentrationen

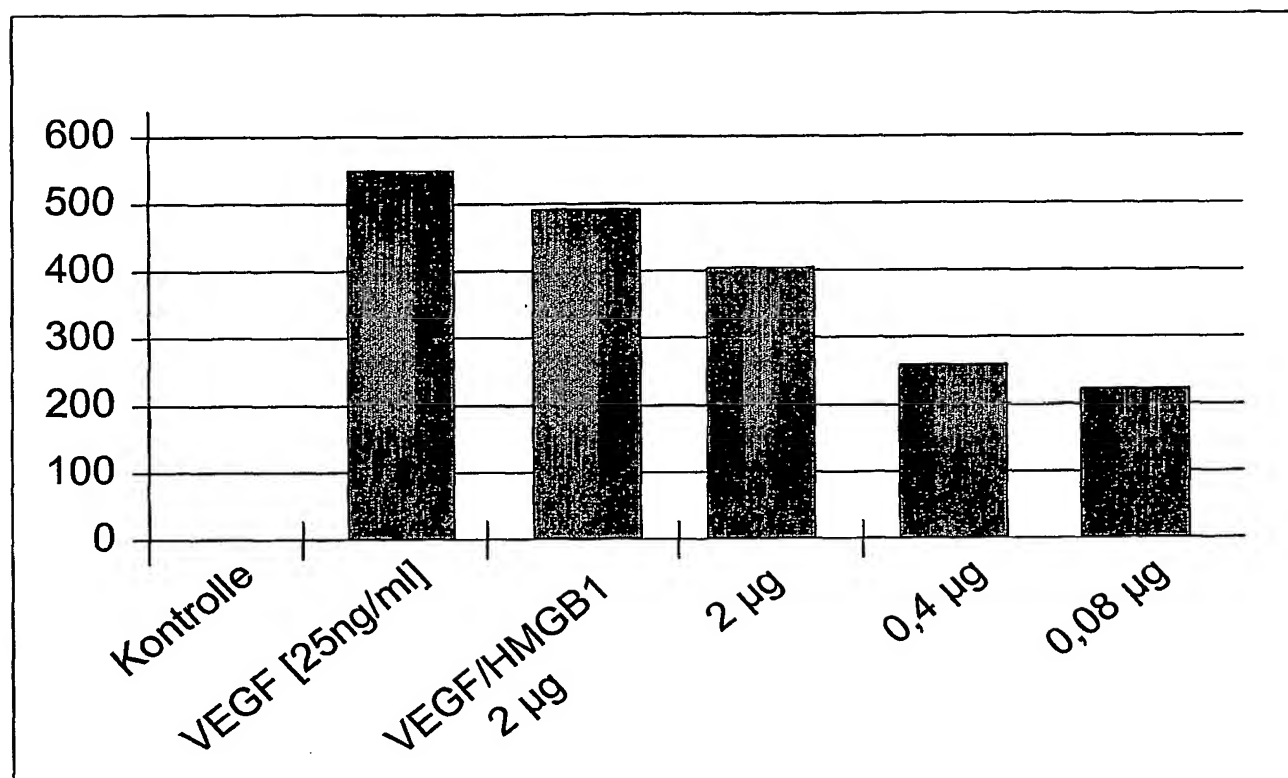


Fig. 1

HMGA1-Konzentrationen

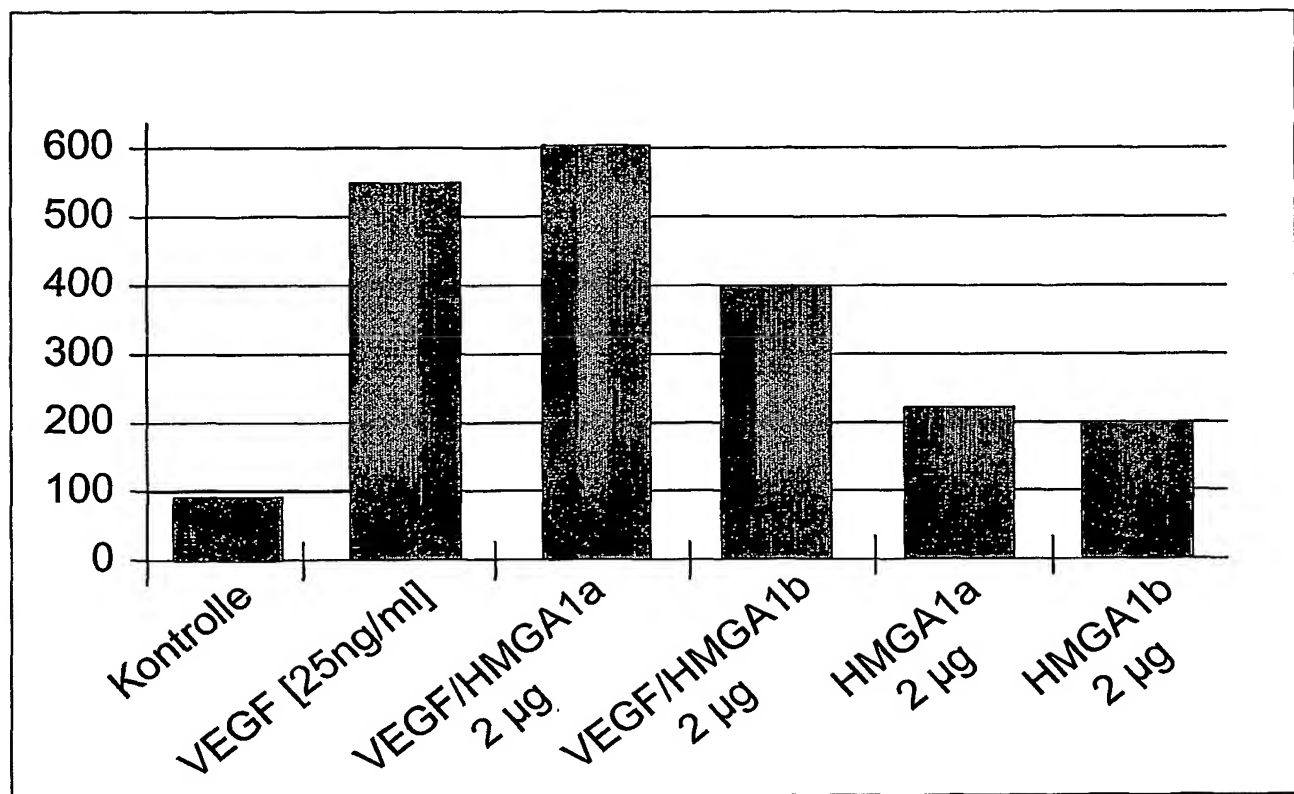


Fig. 2

Erhöhung der Mitoserate durch HMGA1a

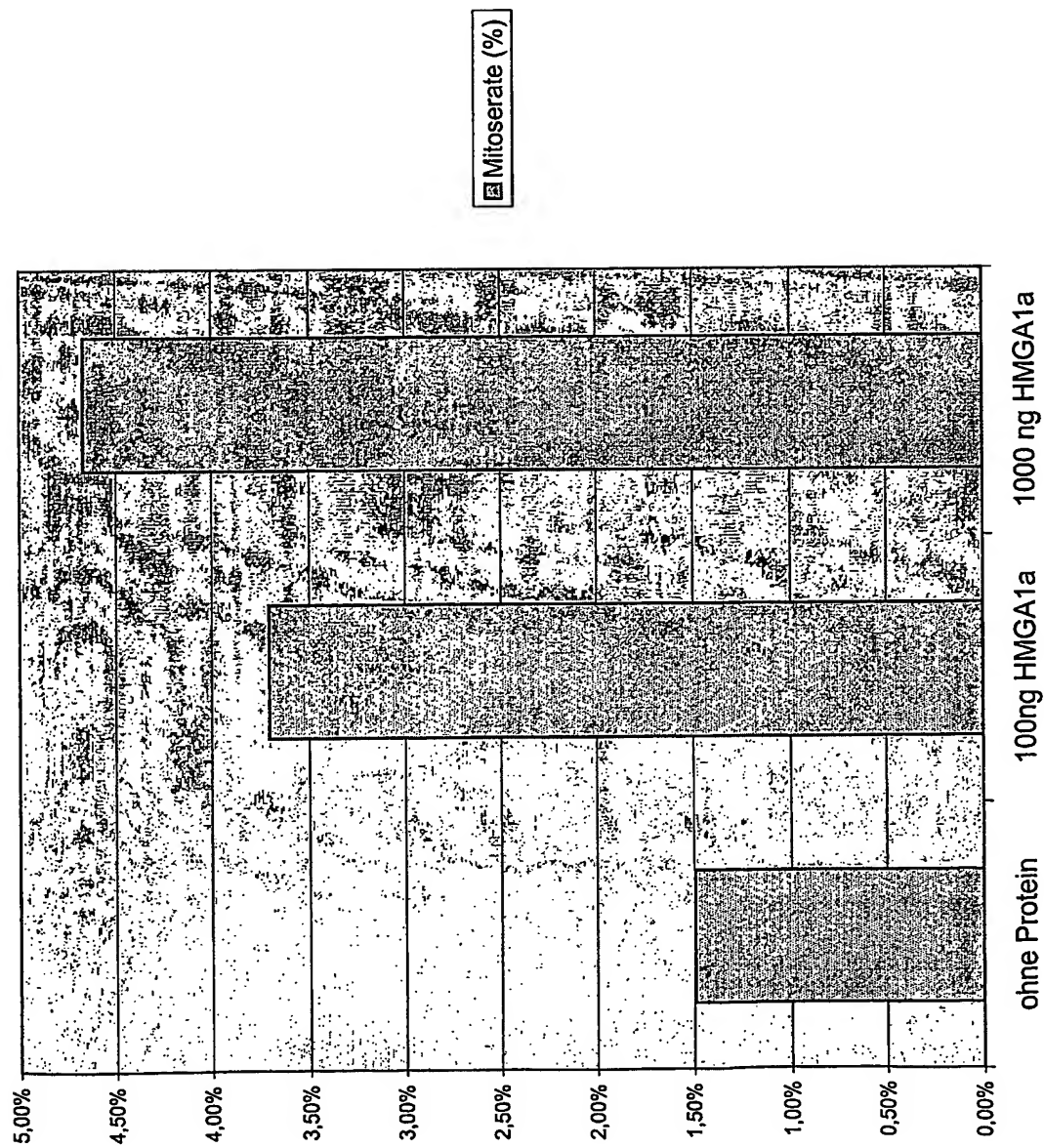
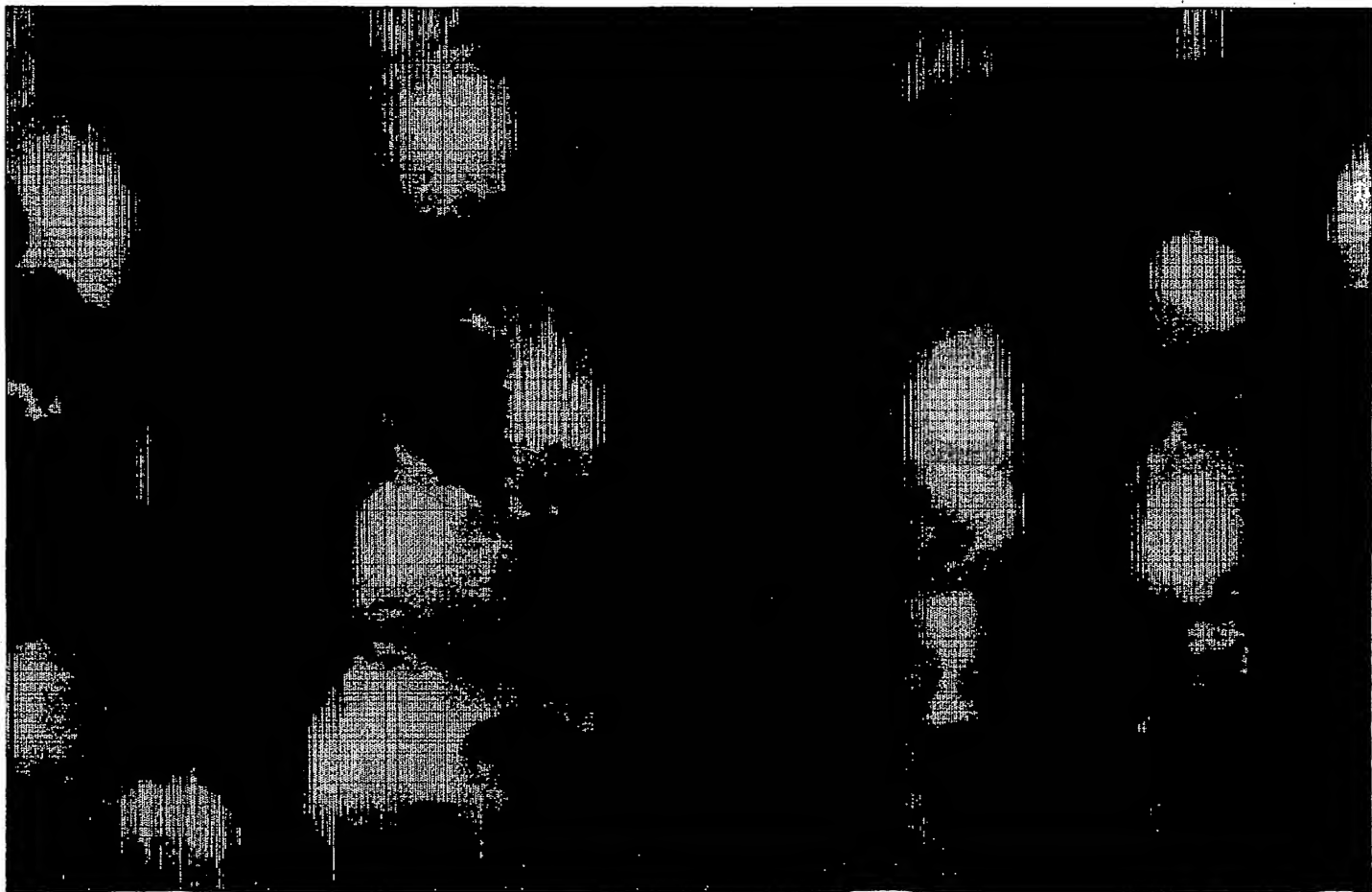


Fig. 3

Fig. 4



5/8

Fig. 5

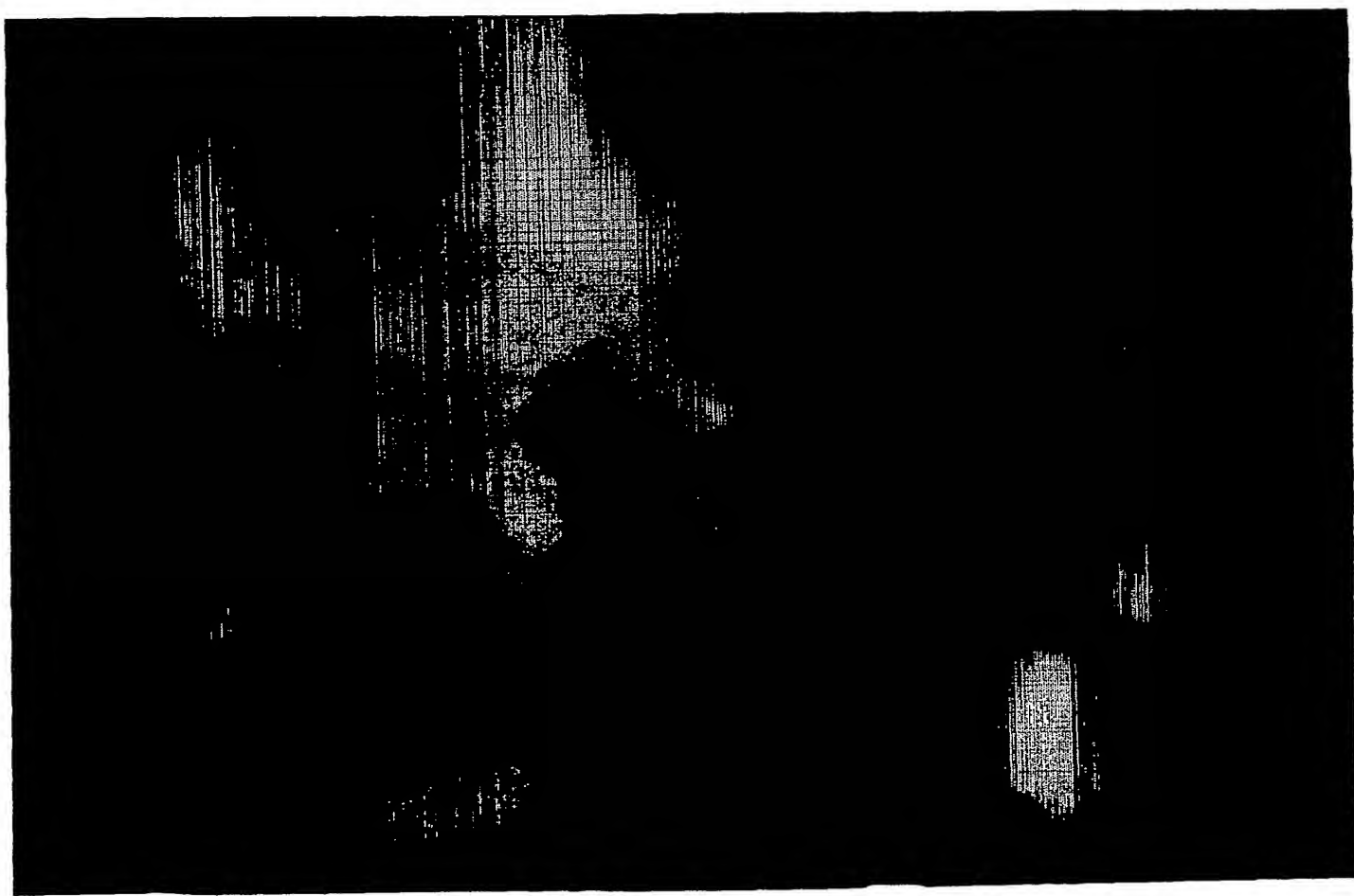
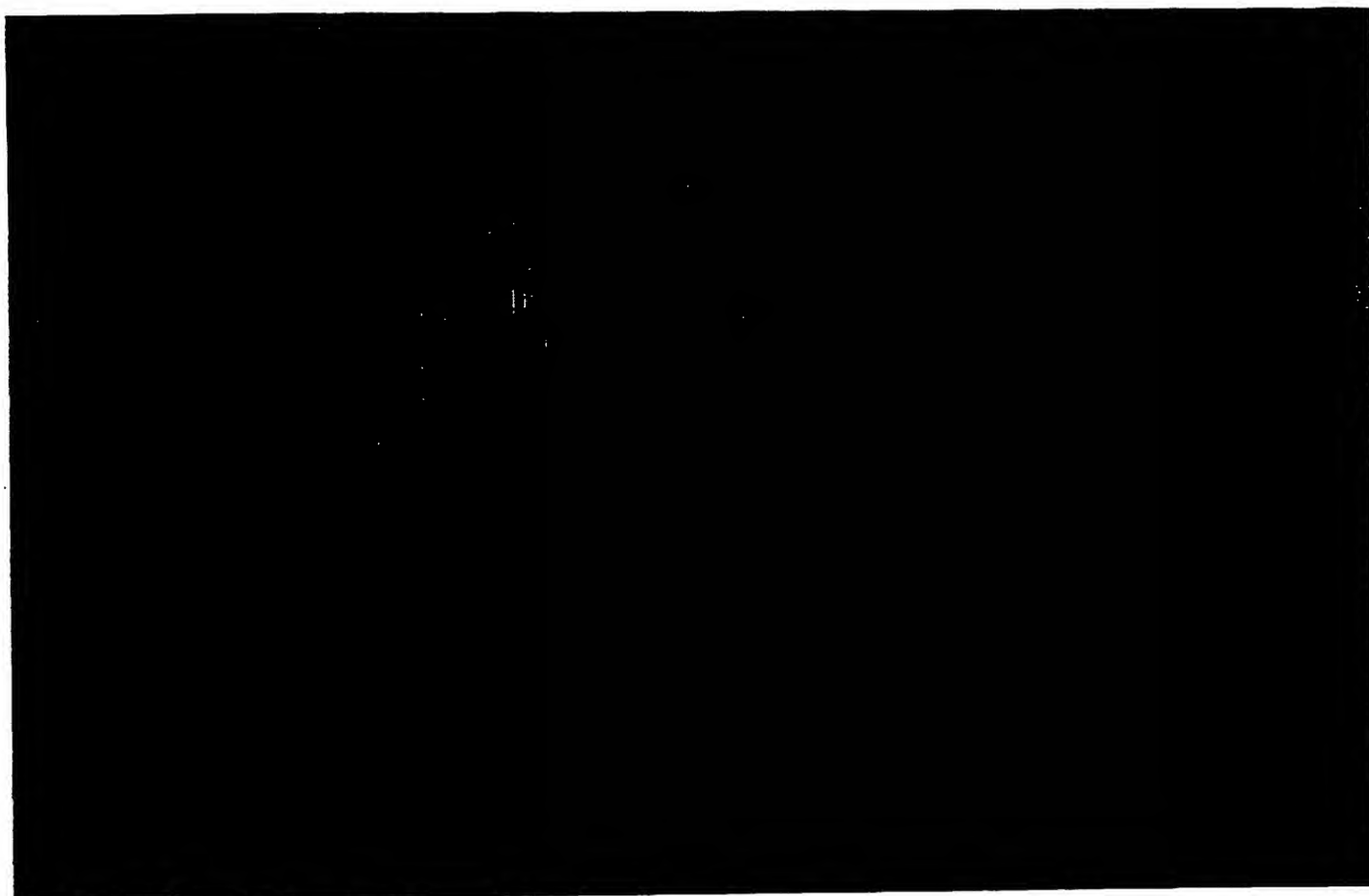
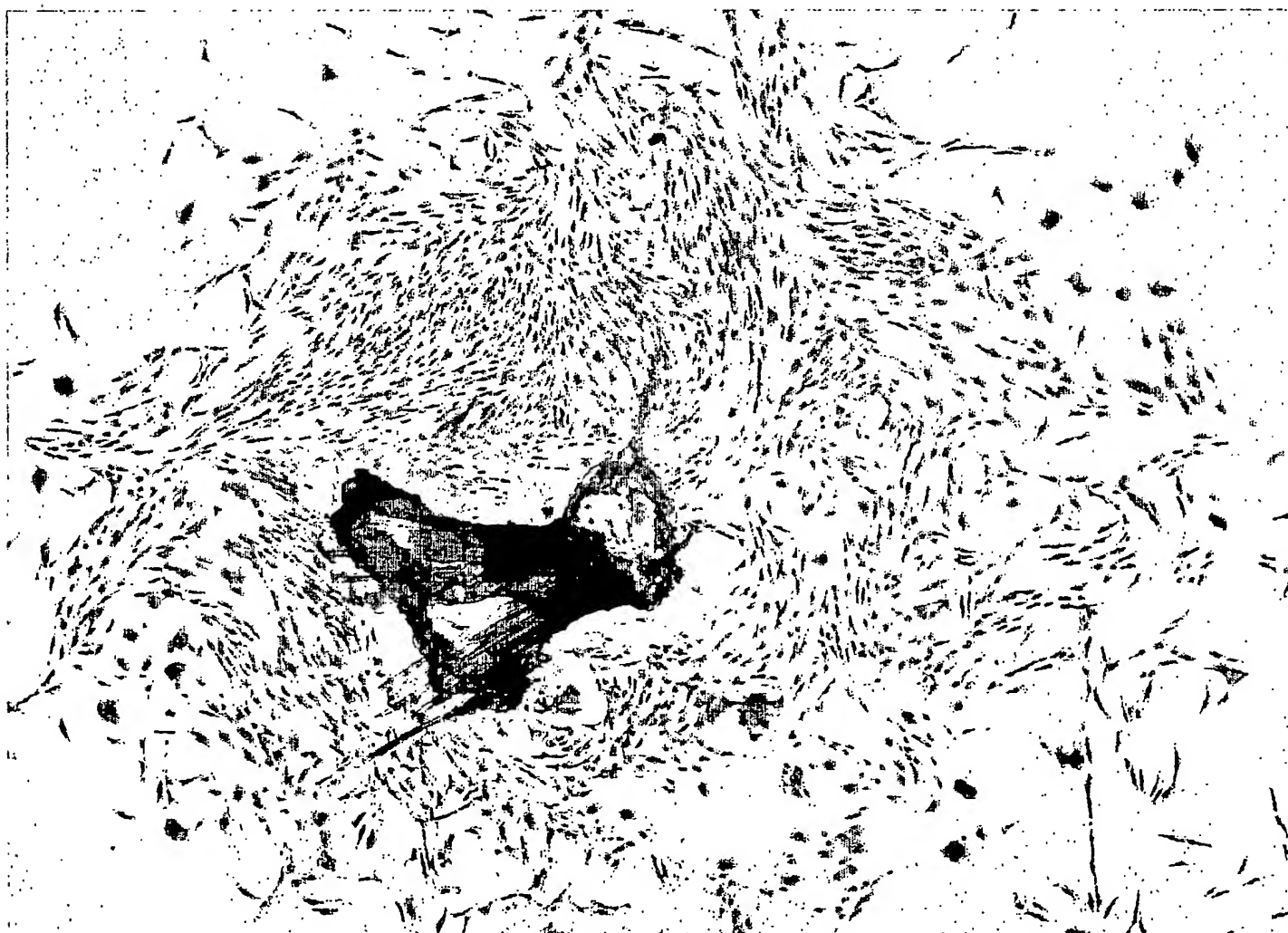


Fig. 6



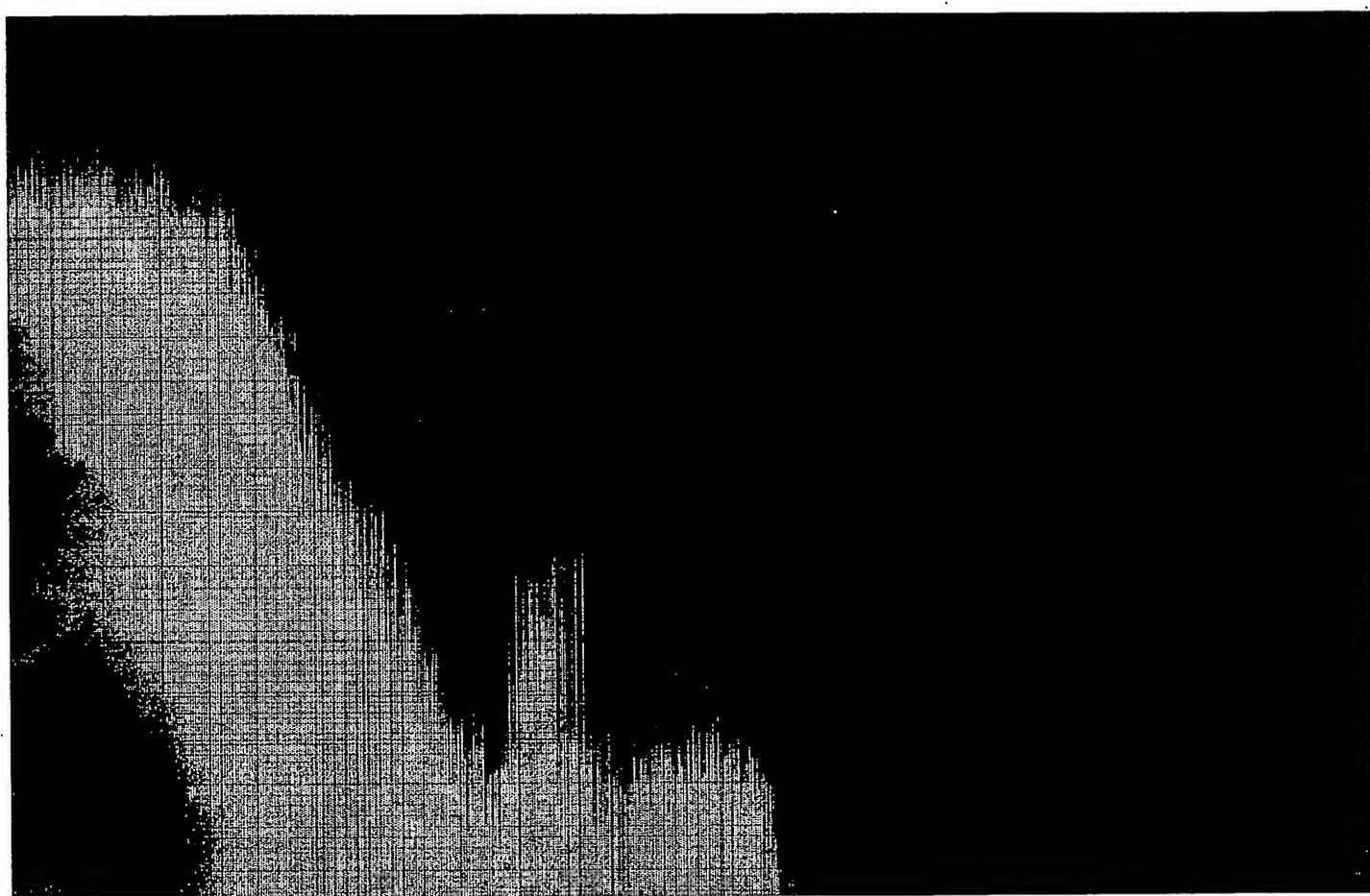
7/8

Fig. 7



8/8

Fig. 8



SEQUENZPROTOKOLL

<110> alcedo biotech GmbH

<120> Verwendungen von DNA-bindenden Proteinen

<130> A 10009 PCT

<160> 64

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln
 1 5 10 15

Glu Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln
 20 25 30

Pro Pro Val Ser Pro Gly Thr Ala Leu Val Gly Ser Gln Lys Glu Pro
 35 40 45

Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser
 50 55 60

Lys Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr Thr Thr Thr Pro Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu Lys Glu Glu Glu Glu
 85 90 95

Gly Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln
 100 105

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln
 1 5 10 15

Glu Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln
 20 25 30

Pro Pro Lys Glu Pro Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly

35

40

45

Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr
 50 55 60

Thr Thr Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu
 65 70 75 80

Lys Glu Glu Glu Glu Gly Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln
 85 90 95

<210> 3
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Glu Glu
 85 90 95

Thr Glu Glu Thr Ser Ser Gln Glu Ser Ala Glu Glu Asp
 100 105

<210> 4
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp

<210> 5
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Glu Glu Phe Tyr Ile Ala Ala
 85 90

<210> 6
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

4/27

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Thr Ile Ala Leu Cys Thr His Trp Ile Asn Ile Cys
 85 90 95

<210> 7
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
 180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 8
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Ala Gly Val Gln Trp Tyr Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro
 85 90 95

Pro Pro Pro Arg Phe Lys Gln Phe Ser Cys Leu Arg Leu Leu Ser Ser
 100 105 110

Trp Asp Tyr Arg His Pro Pro Pro His Pro Ala Asn Phe Cys Ile Phe
 115 120 125

Ser Arg Asp Arg Val Ser Pro Cys Trp Pro Gly Trp Ser Arg Thr Pro
 130 135 140

Asp Leu Arg
 145

<210> 9
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Asp Asn Leu Leu Pro Arg Thr Ser Ser Lys Lys Lys Thr
 85 90 95

Ser Leu Gly Asn Ser Thr Lys Arg Ser His
 100 105

<210> 10
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Trp Leu Leu Met Lys Ser Pro Cys Trp
 85 90

<210> 11
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Tyr Ser
 85 90 95

<210> 12
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Val Asn

8/27

85

90

95

Val Ala Leu Pro Gly Lys Asp His Pro Gly Asn Leu Ile Tyr Leu Leu
 100 105 110

Phe Ser Lys Asn Ala Thr
 115

<210> 13
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Asp
 85 90 95

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys
 1 5 10

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly
 1 5 10

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys
1 5 10

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys
1 5 10

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly
1 5 10

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys
1 5 10

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

10/27

Ser Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly
1 5 10

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Arg Lys Trp Pro Gln Gln
1 5 10 15

Val Val Gln Lys Lys
20

<210> 23
<211> 78
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln
1 5 10 15

Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn
20 25 30

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser
35 40 45

Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala
50 55 60

Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly
65 70 75

<210> 24
<211> 71
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg
1 5 10 15

Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu
20 25 30

Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu
35 40 45

Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu
 50 55 60

Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
 65 70

<210> 25
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn
 20 25 30

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser
 35 40 45

Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala
 50 55 60

Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr
 65 70

<210> 26
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser
 1 5 10 15

Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly
 20 25 30

Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp
 35 40 45

Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr
 50 55 60

Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly
 65 70 75

12/27

<210> 27
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg
 1 5 10 15

Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala
 20 25 30

Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln
 35 40 45

Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp
 50 55 60

Ile Ala Ala Tyr Arg
 65

<210> 28
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg
 1 5 10 15

Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala
 20 25 30

Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln
 35 40 45

Pro

<210> 29
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro Asp Ala Ser Val Lys Phe Ser Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Lys Lys Cys Ser Glu Thr Trp Lys Thr Ile Phe Ala Lys Glu

20 25 30
 Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu
 35 40 45
 Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Lys Lys Lys Lys
 50 55 60
 Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Leu Ala Phe Phe Leu
 65 70 75 80
 Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu
 85 90 95
 Ser Ile Asp Asp Val Val Lys Lys Leu Ala Gly Met Trp Asn Asn Thr
 100 105 110
 Ala Ala Ala Asp Lys Gln Phe Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys
 115 120 125
 Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro
 130 135 140
 Asn Ser Ala Lys Lys Arg Val Val Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Gln Glu Glu Glu Asn Glu
 165 170 175
 Glu Asp Asp Asp Lys
 180

<210> 30
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15
 Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30
 Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45
 Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala

14/27

50 55 60
 Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80
 Arg Lys Trp Asn Thr Leu Glu Gln Cys Asn Val Cys Ser Lys Pro Ile
 85 90 95
 Met Glu Arg Ile Leu Arg Ala Thr Gly Lys Ala Tyr His Pro His Cys
 100 105 110
 Phe Thr Cys Val Met Cys His Arg Ser Leu Asp Gly Ile Pro Phe Thr
 115 120 125
 Val Asp Ala Gly Gly Leu Ile His Cys Ile Glu Asp Phe His Lys Lys
 130 135 140
 Phe Ala Pro Arg Cys Ser Val Cys Lys Glu Pro Ile Met Pro Ala Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Glu Glu Thr Val Arg Ile Val Ala Leu Asp Arg Asp Phe His
 165 170 175
 Val His Cys Tyr Arg Cys Glu Asp Cys Gly Gly Leu Leu Ser Glu Gly
 180 185 190
 Asp Asn Gln Gly Cys Tyr Pro Leu Asp Gly His Ile Leu Cys Lys Thr
 195 200 205
 Cys Asn Ser Ala Arg Ile Arg Val Leu Thr Ala Lys Ala Ser Thr Asp
 210 215 220

Leu
225

<210> 31
 <211> 1873
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> NCIB Accession No. M23614

<400> 31
 gagcacgcgg cgggcgcggt ctctgagcgc ctctgctctc tctcccggtt tcagatccgc 60
 atttgctacc agcggcgggc gcgcggagcc aggccggtcc tcagcgcca gcacggctcc 120
 cggcaaccgg gagcgcgcac cgcagccggc ggccgagctc gcgcatcca gccatcactc 180

ttccacctgc	tccttagaga	aggggaagatg	agtgagtcga	gctcgaagtc	cagccagccc	240
ttggcctcca	agcaggaaaa	ggacggcact	gagaagcggg	gccggggcag	gccgcgcaag	300
cagcctccgg	tgagtcccgg	gacagcgctg	gtagggagtc	agaaggagcc	cagcgaagtg	360
ccaacaccta	agagacctcg	gggccgacca	aagggaagca	aaaacaaggg	tgctgccaa	420
acccggaaaa	ccaccacaac	tccaggaagg	aaaccaaggg	gcagacccaa	aaaactggag	480
aaggaggaag	aggagggcat	ctcgcaggag	tcctcggagg	aggagcagtg	acccatgcgt	540
gccgcctgct	cctcactgga	ggagcagctt	ccttctggga	ctggacagct	ttgctccgct	600
cccaccgccc	ccgccccttc	cccaggccca	ccatcaccac	cgcctctggc	cgccaccccc	660
atcttccacc	tgtgccctca	ccaccacact	acacagcaca	ccagccgctg	caggggctcc	720
catgggcctg	agtggggagc	agttttcccc	tggcctcagt	tcacagctcc	ccccgcccac	780
ccacgcatac	acacatgccc	tcctggacaa	ggctaacatc	ccacttagcc	gcaccctgca	840
cctgctgcgt	cccactccc	ttgggtgggtg	ggacattgct	ctctgggctt	ttgggttggg	900
ggcgccctct	ctgctccttc	actgttccct	ctggcttccc	atagtggggc	ctgggagggg	960
tcccctggcc	ttaaaagggg	cccaagccat	ctcatcctgg	cacgccctac	tccactgccc	1020
tggcacagca	ggtgtggcca	atggaggggg	gtgctggccc	ccaggattcc	cccagccaaa	1080
ctgtctttgt	caccacgtgg	ggctcacttt	tcatccttcc	ccaacttccc	tagtccccgt	1140
actaggttgg	acagccccct	tcggctacag	gaaggcagga	ggggtgagtc	ccctactccc	1200
tcttactgtg	ggccacagcc	cccttgccct	ccgcctggga	tctgagtaca	tattgtgggtg	1260
atggagatgc	agtcacttat	tgtccagggtg	aggcccaaga	gccctgtggc	cgcacctgag	1320
gtgggctggg	gctgctcccc	taaccctact	ttcgttccgc	cactcagcca	tttccccctc	1380
ctcagatggg	gcaccaataa	caaggagctc	accctgcccg	ctcccaaccc	ccctcctgct	1440
cctccctgcc	ccccaaaggtt	ctgggttcca	tttttcctct	gttcacaaac	tacctctgga	1500
cagttgtgtt	gttttttgtt	caatgttcca	ttcttcgaca	tccgtcattg	ctgctgctac	1560
cagcgccaaa	tgttcatcct	cattgcctcc	tgttctgccc	acgatcccct	cccccaagat	1620
actctttgtg	ggaagagggg	ctggggcatg	gcaggctggg	tgaccgacta	ccccagtccc	1680
agggaaagtg	gccctgcccc	taggatgctg	cagcagagtg	agcaaggggg	cccgaatcga	1740
ccataaaggg	tgtagggggc	acctcctccc	cctgttctgt	tggggagggg	tagccatgat	1800
ttgtcccagc	ctggggctcc	ctctctgggtt	tcctatttgc	agttacttga	ataaaaaaaaa	1860
tatccttttc	tgg					1873

<210> 32
 <211> 324
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

```
atgagtgagt cgagctcgaa gtccagccag cccttggcct ccaagcagga aaaggacggc      60
actgagaagc gggggccgggg caggccgcgc aagcagcctc cggtagtcc cgggacagcg      120
ctggtaggga gtcagaagga gcccagcgaa gtgccaacac ctaagagacc tcggggccga      180
ccaaagggaa gcaaaaacaa ggggtgctgcc aagaccgga aaaccaccac aactccagga      240
aggaaaccaa ggggcagacc caaaaaactg gagaaggagg aagaggaggg catctcgag      300
gagtcctcgg aggaggagca gtga                                           324
```

<210> 33

<211> 1875

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> NCIB Accession No. M23616

<400> 33

```
gctttttaag ctcccctgag ccgggtgctgc gctcctctaa ttgggactcc gagccggggc      60
tattttctggg ctggcgcggc tccaagaaga tccgcatttg ctaccagcgg cggccgcgcg      120
gagccaggcc ggtcctcagc gccagcacg gctcccggca acccgagcgg cgcaccgcag      180
ccggcgggcg agctcgcgca tcccagccat cactottcca cctgtcctt agagaagggga      240
agatgagtga gtcgagctcg aagtccagcc agcccttggc ctccaagcag gaaaaggacg      300
gcactgagaa gcggggccgg ggcaggccgc gcaagcagcc tccgaaggag cccagcgaag      360
tgccaacacc taagagacct cggggccgac caaagggaag caaaaacaag ggtgctgcca      420
agaccgggaa aaccaccaca actccaggaa ggaaaccaag gggcagaccc aaaaaactgg      480
agaaggagga agaggagggc atctcgcagg agtcctcgga ggaggagcag tgacccatgc      540
gtgccgcctg ctctcactg gaggagcagc ttctttctgg gactggacag ctttgctccg      600
ctcccaccgc ccccgccct tcccaggcc caccatcacc accgcctctg gccgccaccc      660
ccatcttcca cctgtgccct caccaccaca ctacacagca caccagccgc tgcaggggct      720
cccatggggc tgagtgggga gcagttttcc cctggcctca gttcacagct ccccccgcgc      780
accacgcat acacacatgc ctcctggac aaggctaaca tcccacttag ccgcaccctg      840
cacctgctgc gtcccactc ccttgggtgt ggggacattg ctctctgggc ttttggtttg      900
ggggcgccct ctctgctcct tcactgttcc ctctggcttc ccatagtggg gcctgggagg      960
gttcccctgg ccttaaaagg ggcccaagcc atctcatcct ggcacgccct actccactgc     1020
cctggcacag cagggtgtggc caatggaggg ggggtgctggc cccagagatt ccccagcca     1080
```



```

aactgtcttt gtcaccacgt ggggctcact tttcatcctt cccaacttc cctagtcccc 1140
gtactaggtt ggacagcccc cttcggtac aggaaggcag gagggtgag tcccctactc 1200
cctcttcact gtggccacag ccccttgcc ctccgcctgg gatctgagta catattgtgg 1260
tgatggagat gcagtcactt attgtccagg tgaggcccaa gagccctgtg gccgcacctg 1320
aggtgggctg gggctgctcc cctaacccta ctttcgttcc gccactcagc catttcccc 1380
tcctcagatg gggcaccaat aacaaggagc tcaccctgcc cgctcccaac cccctcctg 1440
ctcctccctg cccccaagg ttctgggttc catttttctt ctgttcacaa actacctctg 1500
gacagttgtg ttgttttttg ttcaatgttc cattcttcga catccgtcat tgctgctgct 1560
accagcgcca aatgttcac ctcattgct cctgttctgc ccacgatccc ctccccaag 1620
atactctttg tgggaagagg ggctggggca tggcaggctg ggtgaccgac taccacagtc 1680
ccagggaagg tggccctgcc cctaggatgc tgcagcagag tgagcaaggg ggcccgaatc 1740
gaccataaag ggtgtagggg ccacctctc cccctgttct gttggggagg ggtagccatg 1800
atttgtccca gcctggggct ccctctctgg ttctctatct gcagttactt gaataaaaaa 1860
aatatccttt tctgg 1875

```

```

<210> 34
<211> 291
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 34
atgagtgagt cgagctcgaa gtccagccag cccttggcct ccaagcagga aaaggacggc 60
actgagaagc ggggcccggg caggccgcgc aagcagcctc cgaaggagcc cagcgaagtg 120
ccaacaccta agagacctcg gggccgacca aagggaagca aaaacaaggg tgctgccaag 180
acccgaaaaa ccaccacaac tccaggaagg aaaccaaggg gcagacccaa aaaactggag 240
aaggaggaag aggagggcat ctgcgaggag tcctcggagg aggagcagtg a 291

```

```

<210> 35
<211> 4111
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 35
acacaccaca cacactcaca ctcacacaca ctcacacaca ctcatcccct tgaatcttgg 60
ggcaggaact cagaaaactt ccagcccggg cagcgcgcgc ttggtgcaag actcaggagc 120
tagcagcccg tccccctccg actctccggt gccgcgcgtg cctgctcccg ccaccctagg 180
aggcgcgggt ccaccacta ctctgtctc tgctgtgtc ccgtgcccga ccctatcccg 240
gcggagtctc cccatctctc tttgctttcc gactgcccga ggcactttca atctcaatct 300
cttctctctc tctctctctc tctctgtctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc 360

```

agggtggggg	gaagaggagg	aggaattctt	tccccgccta	acatttcaag	ggacacaatt	420
cactccaagt	ctcttccctt	tccaagccgc	ttccgaagtg	ctcccgggtgc	ccgcaactcc	480
tgatcccaac	ccgcgagagg	agcctctgcg	acctcaaagc	ctctcttctt	tctccctcgc	540
ttccctcttc	ctcttgotac	ctccacctcc	accgccacct	ccacctccgg	caccaccca	600
ccgccgccgc	cgccaceggc	agcgctctct	cctctctctc	tcctcctccc	ctcttctctt	660
tttggcagcc	gctggacgtc	cggtgttgat	ggtggcagcg	gcggcagcct	aagcaacagc	720
agccctcgca	gcccgcacgc	tcgcgctcgc	cccgccggcg	tccccagccc	tatcacctca	780
tctcccgaaa	ggtgctgggc	agctccgggg	cggtcgaggc	gaagcggctg	cagcggcggg	840
agcggcggcg	ggaggcagga	tgagcgcacg	cggtgagggc	gcggggcagc	cgtccacttc	900
agcccaggga	caacctgccg	ccccagcgcc	tcagaagaga	ggacgcggcc	gccccaggaa	960
gcagcagcaa	gaaccaaccg	gtgagccctc	tcctaagaga	cccaggggaa	gacccaaagg	1020
cagcaaaaac	aagagtcctt	ctaaagcagc	tcaaaaagaa	gcagaagcca	ctggagaaaa	1080
acggccaaga	ggcagacctt	ggaaatggcc	acaacaagtt	gttcagaaga	agcctgtctc	1140
ggaggaaact	gaagagacat	cctcacaaga	gtctgccgaa	gaggactagg	gggcgcaacg	1200
ttcgatttct	acctcagcag	cagttggatc	ttttgaaggg	agaagacact	gcagtgacca	1260
cttattctgt	attgccatgg	tctttccact	ttcatctggg	gtgggggtggg	gtgggggtggg	1320
ggaggggggg	gtgggggtggg	gagaaatcac	ataaccttaa	aaaggactat	attaatcacc	1380
ttctttgtaa	tcccttcaca	gtcccagggt	tagtgaaaaa	ctgctgtaaa	cacaggggac	1440
acagcttaac	aatgcaactt	ttaattactg	ttttcttttt	tcttaaccta	ctaatagttt	1500
gttgatctga	taagcaagag	tgggcgggtg	agaaaaaccg	aattgggttt	agtcaatcac	1560
tgcactgcat	gcaaacaaga	aacgtgtcac	acttgtgacg	tcgggcattc	atataggaag	1620
aacgcgggtg	gtaacactgt	gtacacctca	aataccaccc	caaccactc	cctgtagtga	1680
atcctctgtt	tagaacacca	aagataagga	ctagatacta	ctttctcttt	ttcgtataat	1740
cttgtagaca	cttacttgat	gatttttaac	tttttatttc	taaatgagac	gaaatgctga	1800
tgtatccttt	cattcagcta	acaaactaga	aaaggttatg	ttcatttttc	aaaaagggaa	1860
gtaagcaaac	aaatattgcc	aactcttcta	tttatggata	tcacacatat	cagcaggagt	1920
aataaattta	ctcacagcac	ttgttttcag	gacaacactt	cattttcagg	aatctactt	1980
cctacagagc	caaatgccca	tttagcaata	aataacactt	gtcagcctca	gagcatttaa	2040
ggaaactaga	caagtaaaat	tatcctcttt	gtaatttaat	gaaaagggtac	aacagaataa	2100
tgcattgatga	actcacctaa	ttatgaggtg	ggaggagcga	aatctaaatt	tcttttgcta	2160
tagttataca	tcaattttaa	aagcaaaaaa	aaaaaggggg	gggcaatctc	tctctgtgtc	2220

tttctctctc	tctctccctc	tccctctctc	ttttcatgtg	tatcagtttc	catgaaagac	2280
ctgaatacca	cttacctcaa	attaagcata	tgtgttactt	caagtaatac	gttttgacat	2340
aagatgggtg	accaaggtgc	ttttcttcgg	cttgagttca	ccatctcttc	attcaaactg	2400
cacttttagc	cagagatgca	atatatcccc	actactcaat	actacctctg	aatgttacaa	2460
cgaatttaca	gtctagtact	tattacatgc	tgctatacac	aagcaatgca	agaaaaaac	2520
ttactgggta	ggtgattota	atcatctgca	gttctttttg	tacacttaat	tacagttaaa	2580
gaagcaatct	ccttactgtg	tttcagcatg	actatgtatt	tttctatggt	tttttaatta	2640
aaaattttta	aaatacttgt	ttcagcttct	ctgctagatt	tctacattaa	cttgaaaatt	2700
ttttaaccaa	gtcgctccta	ggttcttaag	gataattttc	ctcaatcaca	ctacacatca	2760
cacaagattt	gactgtaata	tttaaataatt	accctccaag	tctgtacctc	aaatgaattc	2820
tttaaggaga	tggactaatt	gacttgcaaa	gacctacctc	cagacttcaa	aaggaatgaa	2880
cttggtactt	gcagcattca	tttggttttt	caatgtttga	aatagttcaa	actgcagcta	2940
accctagtca	aaactatttt	tgtaaaagac	atgtgataga	aaggaacacg	tttttacata	3000
cttttgcaaa	ataagtaaat	aataaataaa	ataaagccaa	ccttcaaaga	acttgaagct	3060
ttgtaggtga	gatgcaacaa	gccctgcttt	tgcataatgc	aatcaaaaat	atgtgttttt	3120
aagattagtt	gaatataaga	aaatgcttga	caaataat	catgtat	acacaaatgt	3180
gattttttgta	atatgtctca	accagattta	ttttaaacgc	ttcttatgta	gagtttttat	3240
gcctttctct	cctagttagt	gtgctgactt	tttaacatgg	tattatcaac	tgggccagga	3300
ggtagtttct	catgacggct	tttgtcagta	tggcttttag	tactgaagcc	aaatgaaact	3360
caaaaccatc	tctcttccag	ctgcttcagg	gaggtagttt	caaaggccac	atacctctct	3420
gagactggca	gacgctcac	tgttgtgaat	caccaaagga	gctatggaga	gaattaaaac	3480
tcaacattac	tgttaaactgt	gcgttaata	agcaaataaa	cagtggctca	taaaaataaa	3540
agtcgcattc	catatctttg	gatgggcctt	ttagaaacct	cattggccag	ctcataaaat	3600
ggaagcaatt	gctcatgttg	gccaaacatg	gtgcaccgag	tgatttccat	ctctggtaaa	3660
gttacacttt	tatttcctgt	atgttgtaca	atcaaaacac	actactacct	cttaagtccc	3720
agtatacctc	atttttcata	ctgaaaaaaa	aagcttgtgg	ccaatggaac	agtaagaaca	3780
tcataaaatt	tttatatata	tagtttat	ttgtgggaga	taaattttat	aggactgttc	3840
tttgctgttg	ttggtcgcag	ctacataaga	ctggacattt	aacttttcta	ccatttctgc	3900
aagttaggta	tgtttgcagg	agaaaagtat	caagacgttt	aactgcagtt	gactttctcc	3960
ctgttccttt	gagtgctctc	taactttatt	ctttgttctt	tatgtagaat	tgctgtctat	4020
gattgtactt	tgaatcgctt	gcttggtgaa	aatatttctc	tagtgtatta	tcactgtctg	4080
ttctgcacaa	taaacataac	agcctctgtg	a			4111

<210> 36
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 36
atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggag ccggtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggc cacaacaagt tgttcagaag aagcctgctc aggaggaaac tgaagagaca 300
tcctcacaag agtctgccga agaggactag 330

<210> 37
<211> 252
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggag ccggtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggg ga 252

<210> 38
<211> 273
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 38
atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggag ccggtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggg aggagtttta cattgcagct tag 273

<210> 39
<211> 291
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggag ccggtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60

gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggc ctactattgc actttgcaca cactggataa acatctgctg a 291

<210> 40

<211> 1207

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> NCIB Accession No. NM_002128

<400> 40

gagacagcgc cggggcaagt gagagccgga cgggcactgg gcgactctgt gcctcgctga 60
ggaaaaataa ctaaaccatgg gcaaaggaga tcctaagaag ccgagaggca aaatgtcatc 120
atatgcattt tttgtgcaaa cttgtcggga ggagcataag aagaagcacc cagatgcttc 180
agtcaacttc tcagagtttt ctaagaagtg ctcagagagg tggaagacca tgtctgctaa 240
agagaaagga aaatttgaag atatggcaaa ggcggaacaag gcccgttatg aaagagaaat 300
gaaaacctat atccctccca aaggggagac aaaaaagaag ttcaaggatc ccaatgcacc 360
caagaggcct ccttcggcct tcttcctctt ctgctctgag tatcgcccaa aaatcaaagg 420
agaacatcct ggcctgtcca ttggtgatgt tgcaagaaa ctgggagaga tgtggaataa 480
cactgctgca gatgacaagc agccttatga aaagaaggct gcgaagctga aggaaaaata 540
cgaaaaggat attgctgcat atcgagctaa aggaaagcct gatgcagcaa aaaaggaggt 600
tgtcaaggct gaaaaaagca agaaaaagaa ggaagaggag gaagatgagg aagatgaaga 660
ggatgaggag gaggaggaag atgaagaaga tgaagatgaa gaagaagatg atgatgatga 720
ataagttggt tctagcgcag ttttttttct ttgtctataa agcatttaac cccctgtac 780
acaactcact cctttttaag aaaaaaattg aaatgtaagg ctgtgtaaga tttgttttta 840
aactgtacag tgtctttttt tgtatagtta acacactacc gaatgtgtct ttagatagcc 900
ctgtcctggg ggtattttca atagccacta accttgctg gtacagtatg ggggttgtaa 960
attggcatgg aaattttaag caggttcttg ttggtgcaca gcacaaatta gttatatatg 1020
gggatggtag ttttttcatc ttcagttgtc tctgatgcag cttatacgaa ataattgttg 1080
ttctgttaac tgaataccac tctgtaattg caaaaaaaaa aaaagttgca gctgttttgt 1140
tgacattctg aatgcttcta agtaaataca atttttttta ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
aaaaaaaa 1207

<210> 41
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc attttttgtg 60
 caaacttgtc gggaggagca taagaagaag caccagatg cttcagtcaa cttctcagag 120
 ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt 180
 gaagatatgg caaaggcgga caaggcccggt tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240
 cccaaagggg agacaaaaaa gaagttcaag gatcccaatg cacccaagag gcctccttcg 300
 gccttcttcc tcttctgctc tgagtatcgc ccaaaaatca aaggagaaca tcctggcctg 360
 tccattggtg atgttgcgaa gaaactggga gagatgtgga ataacactgc tgcagatgac 420
 aagcagcctt atgaaaagaa ggctgcgaag ctgaaggaaa aatacgaaaa ggatattgct 480
 gcatatcgag ctaaaggaaa gcctgatgca gcaaaaaagg gagttgtcaa ggctgaaaaa 540
 agcaagaaaa agaaggaaga ggaggaagat gaggaagatg aagaggatga ggaggaggag 600
 gaagatgaag aagatgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa 648

<210> 42
 <211> 444
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggag ccgccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggg ctggagtgc gtggtacaat ctgggctcat tgcaacctcc acctcccagg 300
 ttcaagcaat tctcctgcct caggctcctg agtagttggg attacaggca cccaccacca 360
 caccagcta atttttgtat ttttagtaga gacagggttt caccatgttg gccaggctgg 420
 tctcgaactc ctgacctcag gtga 444

<210> 43
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggag ccgccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180

tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggg acaatctact accaagaacc agctccaaga agaaaacatc tctgggaaac 300
agtaccaaaa ggagtcactg a 321

<210> 44
<211> 279
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 44
atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtagagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggg ggttgctaata gaagagcccc tgctgggtga 279

<210> 45
<211> 291
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 45
atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtagagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggc cacaacaagt tggttcagaag aagcctgctc agtattcctg a 291

<210> 46
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtagagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggc cacaacaagt tggttcagaag aagcctgctc aggtcaatgt tgccttgctc 300
gggaaggacc acccgggcaa tcttatatat ctactgttct ctaaaaatgc cacttag 357

<210> 47
<211> 288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggc cacaacaagt tgttcagaag aagcctgctc aggactga 288

<210> 48

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

actgagaagc ggggccgggg caggccgcgc aag 33

<210> 49

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

acacctaaga gacctcgggg ccgaccaaag gga 33

<210> 50

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

actccaggaa ggaaaccaag gggcagaccc aaaaaa 36

<210> 51

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

actgagaagc ggggccgggg caggccgcgc aag 33

<210> 52

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

acacctaaga gacctcgggg ccgaccaaag gga 33

<210> 53

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53
actccaggaa ggaaaccaag gggcagaccc aaaaaa 36

<210> 54
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 54
cctcagaaga gaggacgagg ccgccccagg aag 33

<210> 55
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 55
tctcctaaga gacccagggg aagacccaaa ggc 33

<210> 56
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 56
actggagaaa aacggccaag aggcagacct aggaaatggc cacaacaagt tggtcagaag 60
aag 63

<210> 57
<211> 234
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 57
cctaagaagc cgagaggcaa aatgtcatca tatgcatttt ttgtgcaaac ttgtcgggag 60
gagcataaga agaagcaccc agatgcttca gtcaacttct cagagttttc taagaagtgc 120
tcagagaggt ggaaggtaag agggcttaaa acatgctaac aaggtaatta aaagacagtt 180
tccaattgag gatgcaaaaa aaagcctagt tggcattctc gtagtgggac gcta 234

<210> 58
<211> 213
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 58
ccgagaggca aaatgtcatc atatgcattt tttgtgcaaa cttgtcggga ggagcataag 60
aagaagcacc cagatgcttc agtcaacttc tcagagtttt ctaagaagtg ctacagagagg 120
tggaagacca tgtctgctaa agagaaagga aaatttgaag atatggcaaa ggcggacaag 180
gcccgttatg aaagagaaat gaaaacctat atc 213

<210> 59
<211> 219
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 59
cctaagaagc cgagaggcaa aatgtcatca tatgcatttt ttgtgcaaac ttgtcgggag 60
gagcataaga agaagcacc c agatgcttca gtcaacttct cagagttttc taagaagtgc 120
tcagagaggt ggaagaccat gtctgctaaa gagaaaggaa aatttgaaga tatggcaaag 180
gcggacaagg cccgttatga aagagaaatg aaaacctat 219

<210> 60
<211> 225
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 60
cccaatgcac ccaagaggcc tccttcggcc ttcttcctct tctgctctga gtatcgccca 60
aaaatcaaag gagaacatcc tggcctgtcc attggtgatg ttgcgaagaa actgggagag 120
atgtggaata acactgctgc agatgacaag cagccttatg aaaagaaggc tgcgaagctg 180
aaggaaaaat acgaaaagga tattgctgca tatcgagcta aagga 225

<210> 61
<211> 207
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 61
ccaagaggc ctccttcggc cttcttcctc ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa 60
ggagaacatc ctggcctgtc cattggtgat gttgcgaaga aactgggaga gatgtggaat 120
aacactgctg cagatgacaa gcagccttat gaaaagaagg ctgcgaagct gaaggaaaaa 180
tacgaaaagg atattgctgc atatcga 207

<210> 62
<211> 147
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 62
ccaagaggc ctccttcggc cttcttcctc ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa 60
ggagaacatc ctggcctgtc cattggtgat gttgcgaaga aactgggaga gatgtggaat 120
aacactgctg cagatgacaa gcagcct 147

<210> 63
<211> 546
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

```

gaggagcata agaagaagaa cccagatgct tcagtcaagt tctcagagtt tttaaagaag      60
tgctcagaga catggaagac catttttgct aaagagaaag gaaaatttga agatatggca     120
aaggcggaca aggccatta tgaagagaa atgaaaacct atatccctcc taaaggggag      180
aaaaaaaaaga agttcaagga tccaatgca cccaagaggc ctcccttggc ctttttcctg     240
ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa ggagaacatc ctggcctgtc cattgatgat      300
gttgtgaaga aactggcagg gatgtggaat aacaccgctg cagctgacaa gcagttttat      360
gaaaagaagg ctgcaaagct gaaggaaaaa tacaaaaagg atattgctgc atatcgagct      420
aaaggaaagc ctaattcagc aaaaaagaga gttgtcaagg ctgaaaaaag caagaaaaag      480
aaggaagagg aagaagatga agaggatgaa caagaggagg aaaatgaaga agatgatgat      540
aaataa                                           546

```

<210> 64

<211> 678

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

```

atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgccactt cagcccaggg acaacctgcc      60
gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc     120
ggtgagccct ctctaagag acccagggga agaccocaaag gcagcaaaaa caagagtccc      180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct      240
aggaaatgga atactctgga gcagtgcaat gtgtgttcca agcccatcat ggagcggatt      300
ctccgagcca ccgggaaggc ctatcatcct cactgtttca cctgcgtgat gtgccaccgc      360
agcctggatg ggatcccatt cactgtggat gctggcgggc tcattcactg cattgaggac      420
ttccacaaga aatttgcccc gcggtgttct gtgtgcaagg agcctattat gccagccccg      480
ggccaggagg agactgtccg tattgtggct ttggatcgag atttccatgt tctactgtac      540
cgatgcgagg attgcggtgg tctcctgtct gaaggagata accaaggctg ctacccttg      600
gatgggcaca tcctctgcaa gacctgcaac tctgcccgca tcagggtgtt gaccgccaag      660
gcgagcactg acctttag                                           678

```

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**